

- UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2 -  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THÈSE

*en vue d'obtenir le grade de*

**Docteur de l'Université Montpellier 2**

*Ecole doctorale : SIBAGHE*

*Discipline : Evolution, Ecologie, Ressources Génétiques, Paléontologie*

*présentée et soutenue publiquement le 24 septembre 2010 par*

Hélène JOURDAN

**Pélodyte ponctué : Petites histoires évolutives**

Variabilité des traits d'histoire de vie en populations fragmentées :  
stratégies de reproduction chez le Pélodyte ponctué,  
*Pelodytes punctatus* (Anoure).

**Jury :**

Pierre-André	CROCHET	CR1, CNRS, CEFE	Directeur de thèse
Jacques	DAVID	Professeur, Supagro	Examineur
Patrice	DAVID	DR2, CNRS, CEFE	Directeur de thèse
Pierre	JOLY	Professeur, UCBLI	Rapporteur
Nicolas	PERRIN	Professeur, UNIL	Rapporteur
Céline	TEPLITSKY	CR2, CNRS, MNHN	Examineur





FIGURE 1 – Illustration inspirée de l'art aborigène de Colombie Britannique





# Remerciements

Un grand merci à Patrice et à Pac, mes deux directeurs de thèse. Vous avez été très complémentaires dans cette thèse : vos emplois du temps, vos caractères (l'un toujours prêt à monter de nouveaux projets, l'autre plus réaliste), vos connaissances et vos points de vue sur les articles et le manuscrit de thèse (désolée Pac, je sais que tu aurais voulu quelque chose de plus conventionnel...).

Pac, l'oiseau migrateur. Grâce à toi je sais identifier quelques espèces d'amphibiens (dont le Pélodyte !...je crois que je vais finir par m'offrir un guide des amphibiens) et j'ai fait plein de biblio (ah, l'angoisse de recevoir les mails remplis de références biblio que tu m'envoyais avant de corriger un brouillon d'article !). J'ai failli me mettre au yoga pour gérer mon stress lorsque tu ne relisais pas mes articles ! Mais finalement, j'ai réussi à finir dans les temps (avant que tu ne rendes ton HDR !). Merci pour tes points de vue critiques et utiles sur mon travail. Merci aussi pour avoir fait du terrain lorsqu'il manquait du monde.

Patrice, merci pour ta gentillesse et ton efficacité. Tu m'as fait découvrir la génétique quantitative et j'ai bien envie d'approfondir mes connaissances quand l'occasion s'en présentera. J'ai progressé en stats avec ton aide mais il me reste encore beaucoup à apprendre ("à bas les ZIP et les ZINB et vivent les bons vieux modèles !" : conclusion d'un mois de stats sous R). Je me suis fait des noeuds aux neurones en discutant avec toi mais j'y ai toujours beaucoup appris (même s'il me fallait trois jours pour digérer une discussion d'une heure !). Merci surtout pour m'avoir prévenue que je ne bosserai pas en congé maternité mais que je profiterai de ces moments magiques (je suis tout de même partie avec tous mes classeurs...pour rien !).

Merci à François Bonhomme, Ophélie Ronce, Olivier Gimenez, Philippe Geniez, Philippe Jarne, Marc Cheylan, Rick Relyea et Pierre Joly, membres de mes comités de thèse, pour vos conseils avisés sur mon travail. Un merci de plus à Philippe Geniez pour les échantillons de Pélodyte complémentaires, les nombreux atlas, la base de données Languedoc-Roussillon et les échanges en tous genres. Merci Rick pour ton aide sur mon premier manuscrit et pour les nombreuses discussions autour d'un café (non, toujours pas de café pour moi).

Merci à Pierre Joly et Nicolas Perrin, rapporteurs de cette thèse. Merci d'avoir sacrifié une partie de votre été (et de vos vacances ?) pour lire mon manuscrit. Pierre Joly a fait partie de l'aventure Pélodyte dès le début et Nicolas Perrin m'accueillera peut-être dans son labo pour la suite (si la demande de bourse réussit, croisons les doigts).

Merci à Céline Téplitsky et Jacques David pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je me souviens d'avoir découvert Céline lors d'un séminaire qu'elle donnait au CEFÉ, j'avais alors Estelle, âgée de 10 jours, contre moi en écharpe (je n'ai pas pu assister à la fin de la présentation, Estelle s'était mise à grogner). Jacques organisait le

cours de génétique quantitative avec Patrice et j'étais contente de ne pas y être en tant qu'élève de Master pour échapper à l'examen final !

Merci à David McKenzie et François Bonhomme pour la bienveillance avec laquelle vous m'avez laissée partir vers une thèse Pélodyte au CEFÉ, abandonnant un projet bar.

Pour leur aide technique : merci à Antoine et Virginie en biologie moléculaire, Jean-Marc Donnay (et le CRBM) pour l'élevage de têtards de crapouilles, Christian et David du TE pour les mares creusées, les mares entourées et le dispositif d'élevage (quelle efficacité !). Un grand merci à Vincent, Alain (tu as assuré pendant mon congé maternité !), Denis, Simon et Jérémy pour toutes les sorties de terrain effectuées à la recherche du Pélodyte. Merci à toute la plate-forme des marqueurs moléculaires pour 3 années de microsatellite (j'ai appris plein de choses, comme : il vaut mieux mettre de l'ADN dans ses mix PCR pour que ça amplifie...mais ça se ratrape !). Merci à Anne G. pour m'avoir aidée à dénicher de vieux articles cachés dans les sous-sols du CEFÉ.

J'en profite pour remercier également Paul Réder qui a bien voulu qu'on entoure deux de ses mares sur son domaine de Comberousse et Joëlle Caillibote qui nous a laissé l'accès à la mare de Seuilles pendant trois ans.

Merci Joy d'avoir choisi d'étudier le Pélodyte pour ton stage de M1. Tu vois, ça débouche sur une jolie publi (je soumetts aujourd'hui, promis). C'était vraiment chouette de bosser avec toi !

Un coucou aux vieux thésards du CEFÉ, ceux qui terminaient leur thèse pendant que je découvrais le CEFÉ et la biologie évolutive : Séb, Anne, Adèle, Claire, Anne-Vio, François et Juan. Un autre aux moins vieux thésards mais qui sont quand même déjà partis : Audrey, Lucie, Antoine D, Noppol, Marc et Valentine. Un dernier coucou et bon courage aux thésards qui vont soutenir à la rentrée avec moi : Ben, Cat, Florence, Delphine, Sandra, Aurélie, Afiwa, Emeline et Ana. Une pensée pour Anne-Laure qui soutiendra plus tard et a tenté comme moi l'aventure "thèse avec bébé" ! Merci à tous pour avoir rendu ces trois années si conviviales.

Merci à tous les membres de l'équipe GenDyn : Patrice, Philippe, Patricia, Violette, Ben, Thomas, François, Elodie et Adeline... et aussi ceux qui ne sont plus là : Séb, Juan, Marta (raté, c'était une fille !), Joy, Jérémy, Elsa, Josh (hé, hé, je comptais des œufs de tes physes le jour de Noël !), Antoine, Virginie, John, Rick...j'espère que je n'ai oublié personne !

Un merci particulier à Ben, mon cothésard, pour avoir partagé les bons et les moins bons moments (ah ! je n'oublierai pas les séances de copulation de physes... !). Un autre pour Thomas, bon courage pour la suite ! Un dernier pour Elodie : j'ai bientôt fini de te poser des questions (de stats, de génétique quanti, de Suisse) ... merci aussi pour ta relecture efficace et rapide de mon manuscrit de thèse et encore bravo pour ton poste

(garde-moi une place dans quelques années, je rêve de bosser sur des nématodes !).

Merci à Anne et François. Anne, j'ai largement rentabilisé l'accès biblio ! A tous les deux, merci pour avoir relu une partie de mon manuscrit juste avant de partir en Norvège. Un bisous en passant à Léon (quelle classe quand tu envoies des bisous avec la main !) et à Martin.

Merci à Alex, Gaby, Marie et Myriam pour les nombreux échanges par mails et blog, je n'aurais jamais parié que je serai la première de nous 5 à soutenir ! Marie, c'était important de t'avoir au téléphone dans les moments un peu difficiles...

Merci à la BalTolCorp de nous avoir laissé sa super maison ! Merci aussi pour toutes les soirées de squat lorsque nous étions encore voisins et pour les covoiturages Maison-Boulot.

Merci à mes parents qui m'ont soutenue dans cette aventure dès le tout début en me laissant partir en prépa à Paris. Je me souviens des très nombreuses cartes postales envoyées par ma maman pour me soutenir le moral et des conseils de mon papa pour tenir le coup ("mange des fruits, c'est plein de vitamines !"). Je rédige ce texte pendant que ma maman s'occupe d'Estelle (crèche fermée en août). Merci Maman d'avoir corrigé toutes les fautes de français de mon manuscrit et d'avoir gardé Estelle à Turin et à Montbazin, pendant les vacances de la crèche. Merci à tous les deux pour tout : vous êtes toujours là quand j'en ai besoin.

Merci à mes frère et soeurs. Merci à Anne pour tous tes commentaires très pertinents sur mon manuscrit, à Guillaume pour les petits mots du matin sur Gmail et à Elise pour le tout premier guide d'amphibiens que j'ai lu et les conseils sur les sorties amphibiens.

Merci à James et Nicole pour vos nombreux coups de main. Merci d'avoir gardé Estelle pendant les quatre week-end avant le dépôt de mon manuscrit. Grâce à vous, l'été 2010 a été très studieux et efficace.

Je termine par le plus grand merci. Merci à Estelle et Jef d'avoir accompagné cette thèse (en faisant du terrain avec moi, en m'aidant sur mon élevage de crapouilles, en m'accompagnant à Turin pour l'ESEB ou en compilant mon manuscrit de thèse LaTeX pourtant truffé d'erreurs). Merci surtout de rendre ma vie si joyeuse. On continue l'aventure en Suisse, à trois...ou plutôt quatre (merci Numérobis d'être aussi sage depuis que tu es dans mon ventre) !

## Résumé :

La variabilité phénotypique a tendance à augmenter lorsque l'environnement est variable dans le temps ou l'espace. Cette thèse traite plus précisément de la variabilité des traits d'histoire de vie dans le cadre de populations fragmentées. En région méditerranéenne, le Pélodyte ponctué, *Pelodytes punctatus*, se reproduit à la fois au printemps et en automne, en réponse aux variations temporelles de l'environnement. Nous avons voulu comprendre l'origine et les conséquences évolutives de ces stratégies de reproduction.

Les deux périodes de reproduction produisent efficacement des descendants (plus en automne) et les têtards de printemps semblent souffrir de la compétition avec les têtards d'automne. Ces derniers se métamorphosent plus tôt et à une plus grande taille. Ces différences de développement ne s'expliquent pas par des différences génétiques entre des populations saisonnières. Au contraire, elles sont liées à la plasticité phénotypique et répondent à des conditions environnementales drastiquement différentes. Il semble finalement plus favorable de se reproduire en automne. Le maintien des deux stratégies correspond à du bet-hedging ou un simple opportunisme.

Par ailleurs, la fragmentation, phénomène croissant lié à l'anthropisation des milieux, diminue la taille des populations et augmente l'hétérogénéité génétique au sein d'une population. Nous n'observons cependant pas de consanguinité parmi les populations étudiées mais une forte structuration en familles qui induit des associations allèles/phénotypes.

Ce travail éclaire les variations de traits d'histoire de vie du Pélodyte et indique une grande plasticité phénotypique face aux variations de l'environnement.

## Mots-clés :

**Traits d'histoire de vie, phénologie de reproduction, développement larvaire, plasticité phénotypique, fragmentation, relation génotype/phénotype**

### **Abstract:**

Phenotypic variability tends to increase in temporally and spatially variable environments. This thesis deals with the variability of life-history traits in fragmented populations. In Mediterranean regions, Parsley frog, *Pelodytes punctatus*, breeds both in spring and in autumn, in response to temporal variations of its environment. I studied the origin and evolutionary consequences of its breeding strategies.

Both breeding periods produce offspring (much more in autumn, though) and spring tadpoles suffer from intraspecific competition with older autumn tadpoles. Autumn laid juveniles are bigger and emerged sooner from the ponds. These developmental differences are not due to genetic differences between seasonal populations. They are explained by phenotypic plasticity in response to drastically different conditions. Even if it seems more favourable to breed in autumn, both strategies are maintained either by bet-hedging or pure opportunism.

Besides, fragmentation, which increases with global changes, tends to reduce population effective size and increase genetic heterogeneity within populations. However, no inbreeding was found in the studied populations but a high family structure induced allele/fitness correlations.

Together, these results enlighten the variability of breeding strategies and larval traits in Parsley frog and indicate a high phenotypic plasticity in response to environmental variations.

### **Keywords:**

**Life history traits, breeding phenology, larval development, phenotypic plasticity, fragmentation, genotype/phenotype correlation**

## Avant-propos

Cette thèse vise la compréhension de l'évolution des **traits d'histoire de vie** en populations fragmentées face à des variations temporelles de la sélection. Plus précisément, j'ai étudié l'étude des stratégies de reproduction chez un petit anoure, *Pelodytes punctatus*, le Pélodyte ponctué, face à des contraintes saisonnières. Ce sujet a été abordé sous différents angles qui composent une mosaïque encore incomplète mais terriblement intéressante pour la compréhension de la biologie du Pélodyte ponctué mais aussi, plus largement, de certains mécanismes évolutifs.

Ce manuscrit débute par une introduction très générale ayant pour but d'apporter l'ensemble des informations nécessaires à la compréhension de mes travaux de thèse. J'ai tenté d'être compréhensible par tous, en définissant tous les termes spécifiques dans un glossaire. Les résultats sont présentés sous la forme d'articles scientifiques, en anglais, précédés chacun d'un résumé en français. Une conclusion générale viendra compléter les conclusions spécifiques de chaque article, faire le point sur les connaissances acquises et proposer des perspectives à ce travail.

*S'il fallait tenir compte des services rendus à la Science,  
la grenouille occuperait la première place.*

Claude Bernard, Étude de la médecine expérimentale

# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
1.1	Écologie des amphibiens . . . . .	2
1.1.1	Définition . . . . .	2
1.1.2	Distribution . . . . .	5
1.1.3	Biologie . . . . .	5
1.2	Écologie évolutive . . . . .	12
1.2.1	Quels sont les changements globaux ? . . . . .	12
1.2.2	Réponses des espèces aux changements . . . . .	13
1.2.3	Microévolution . . . . .	13
1.2.4	Plasticité phénotypique . . . . .	16
1.3	Pélodyte ponctué . . . . .	21
1.3.1	Identification . . . . .	21
1.3.2	Répartition du Pélodyte . . . . .	22
1.3.3	Position phylogénétique du Pélodyte . . . . .	23
1.3.4	Biologie du Pélodyte . . . . .	24
1.3.5	Ce qu'on aimerait savoir sur le Pélodyte . . . . .	26
<b>2</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>29</b>
2.1	Suivi de terrain . . . . .	29
2.2	Marqueurs génétiques . . . . .	32
2.2.1	Utilité . . . . .	32
2.2.2	La pratique du génotypage . . . . .	33
2.3	Élevage en laboratoire . . . . .	33
2.3.1	Buts . . . . .	33
2.3.2	Protocole d'élevage . . . . .	34
2.4	Tentatives . . . . .	34
<b>3</b>	<b>Phénologie</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>Plastique/Génétique ?</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>Traits larvaires</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Génotype/Phénotype et fragmentation</b>	<b>139</b>



<b>7 Conclusion</b>	<b>175</b>
7.1 Apports de cette thèse . . . . .	175
7.1.1 Connaissance du Pélodyte . . . . .	175
7.1.2 Vision évolutive . . . . .	178
7.2 Travaux en cours et perspectives . . . . .	179
<b>A Bibliographie</b>	<b>183</b>
<b>B Primer note</b>	<b>197</b>
<b>Glossaire</b>	<b>201</b>



# Chapitre 1

---

## Pourquoi étudier le Pélodyte ponctué ?

Je me suis permis de donner un titre à mon introduction pour indiquer clairement la ligne directrice de cette partie. Je désire apporter ici suffisamment d'éléments pour convaincre le lecteur que le Pélodyte ponctué est le modèle d'étude idéal (ou du moins relativement approprié) pour traiter les questions évolutives qui m'ont intéressée au cours de cette thèse : comment évoluent des **traits d'histoire de vie** dans des populations fragmentées et plus précisément comment émergent et évoluent des stratégies de reproduction. La démarche classique est de partir de la problématique générale puis de présenter le modèle choisi. Ainsi, je pourrais commencer par vous parler, avec beaucoup de sérieux, de la réponse à l'hétérogénéité environnementale spatiale et temporelle, des conséquences de la fragmentation des populations et de l'interaction entre les deux. Puis je pourrais démontrer que les amphibiens sont de bons modèles pour aborder ces questions et surtout que parmi ceux-là, le Pélodyte ponctué est le meilleur.

Lorsqu'on me demande ce que je fais, je réponds toujours que je travaille sur une petite grenouille et de la même façon, j'ai choisi de commencer par présenter les amphibiens pour être tout de suite dans le bain (ou plutôt dans la mare). Je présenterai ensuite les éléments de biologie évolutive nécessaires pour comprendre l'enjeu scientifique des questions que pose le Pélodyte. Finalement, je présenterai le Pélodyte, un animal discret dont la biologie est encore bien peu connue mais semble originale. J'expliquerai ce que l'on connaît du Pélodyte et quelles sont les questions qui s'imposent à un biologiste évolutif découvrant cet animal.

J'enjoins le lecteur batrachologue ou herpétologue à sauter la première partie de cette introduction. N'importe quel spécialiste de la biologie évolutive peut gagner du temps en sautant la deuxième partie de l'introduction. Je recommande toutefois à tous les lecteurs de lire la troisième partie sur le Pélodyte pour connaître les questions qui m'ont animée pendant ces trois ans et qui ont donné lieu à cette thèse.

Alors, pourquoi étudier le Pélodyte ponctué ?

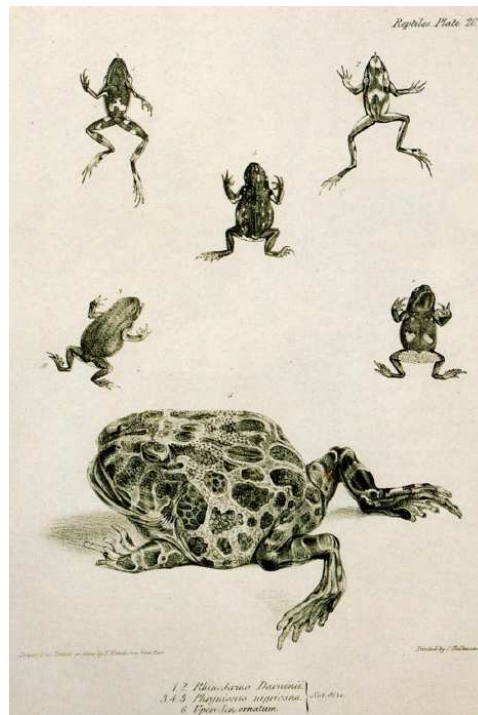


FIGURE 1.1 – Anoures récoltés par Darwin avec le "crapaud de Darwin", *Phryniscus nigricans*, au centre de la planche ([Darwin, 1843])

## 1.1 "Parce que c'est joli !" : écologie des amphibiens

Ce raccourci, légèrement provocateur, n'est pas une introduction avouable dans un contexte scientifique, ainsi que je l'ai indiqué plus haut. C'est pourtant vrai, le Pélodyte est une jolie bestiole... mais là n'est pas la question. La réalité est que le Pélodyte est un joli amphibien (et là non plus ce n'est pas une vraie bonne raison, mais on s'en approche) et que les amphibiens sont des modèles intéressants à la fois en écologie et en évolution. Par ailleurs, il est également intéressant d'étudier les amphibiens pour eux-mêmes, pour mieux les connaître et contribuer peut-être à leur conservation.

Les sections suivantes traitent de l'ensemble des amphibiens, en général et ne traiteront donc pas du Pélodyte en particulier. Elles reposent en grande partie sur l'analyse bibliographique de plusieurs ouvrages généralistes sur les amphibiens [Frazer, 1973; Wells, 2007; Fox, 1984; Clairambault et al., ; Vial, 1973; Beebee, 1996]

### 1.1.1 Qu'est-ce qu'un amphibien ?

Commençons donc par la première définition nécessaire. Il convient tout d'abord de préciser que le terme "amphibien" est l'équivalent de "batracien". Ce dernier terme est cependant moins utilisé de nos jours et je continuerai pendant tout le reste de cette thèse à parler d'amphibiens. Il faudrait pour être plus précis utiliser le terme "Lissam-

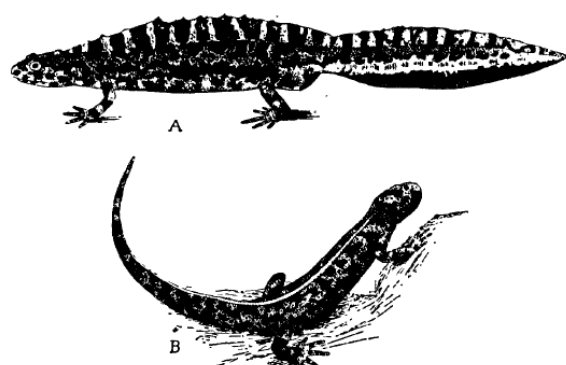


FIGURE 1.2 – Triton marbré, *Triturus marmoratus* : A. Mâle en livrée de noces ; B. Femelle (issu de [Angel, 1946])



FIGURE 1.3 – Siphonops annelé, *Siphonops annulatus*. Monographie tirée de la première édition du Dictionnaire D'Histoire Naturelle de Charles Orbigny (1849)

phibien" qui désigne la seule sous-classe d'amphibiens encore existants (les deux autres, Labyrinthodontia et Lepospondyli sont éteintes).

Prenons une première approximation (rien de scientifique donc) pour définir un amphibien : c'est un animal qui vit dans l'eau et sur terre ou plutôt c'est un animal qui possède une forme aquatique et une forme terrestre. Plus scientifiquement, les amphibiens sont des tétrapodes partageant les **synapomorphies** suivantes : ils ont des dents bicuspidés pédicellées (si, si...), une forme particulière d'organe de l'audition, (*Papilla amphibiorum*) mais également des corps adipeux associés aux gonades, des glandes cutanées spécifiques et une accommodation visuelle par déplacement du cristallin. Il faut avouer que ce n'est pas d'une terrible clarté pour le randonneur du dimanche souhaitant reconnaître un amphibien.

Le plus simple est peut-être de partir d'exemples connus. Il y a trois ordres d'amphibiens : les anoures (Anura), les urodèles (Caudata) et les apodes (Gymnophiona). Les anoures sont des amphibiens sans queue à l'âge adulte, typiquement ce sont ceux qu'on appelle grenouille ou crapaud (Figure 1.1). Il en existe plus de 4800 espèces décrites. Les urodèles gardent une queue même à l'âge adulte : les tritons et les salamandres sont des urodèles (Figure 1.2). On en connaît environ 500 espèces. Les apodes, quant à eux, sont beaucoup moins connus et comptent environ 170 espèces (Figure 1.3). Comme leur nom l'indique, ils n'ont pas de pattes et leur queue est petite voire absente. Ils ressemblent plutôt à des serpents et se retrouvent en Amérique Centrale et du Sud, en Afrique Équatoriale et en Asie du Sud-Est [Wollenberg and Measey, 2009].

Nous nous intéresserons au cours de cette thèse principalement aux anoures et parfois aux urodèles. Les apodes ne feront pas partie des modèles étudiés et à partir d'ici, je parlerai d'amphibiens sans inclure les apodes, pour simplifier le discours.

Chez les anoures, la distinction linguistique grenouille/crapaud ne correspond à aucune réalité phylogénétique mais plutôt à une sorte de description physique. Pour résumer



FIGURE 1.4 – Crapauds dansant au sabbat (issu de [Recoura, 2007])

la dichotomie artificielle : les grenouilles sont agiles et ont une peau lisse alors que les crapauds sont plus patauds et ont une peau verruqueuse (voir ci-dessous).

Les anoures sont étudiés depuis longtemps et ont largement inspiré l'imaginaire populaire (Figure 1.4) mais également les naturalistes. Beaucoup s'extasiaient sur la charmante rainette et ne trouvaient pas de mots assez forts pour décrire l'affreux crapaud, ainsi que le montre cet extrait d'un ouvrage naturaliste de La Cépède, commandé par Buffon au 18<sup>e</sup> siècle [De La Cépède, 1788] :

"Tout en est vilain, jusqu'à son nom, qui est devenu le signe d'une basse difformité [...] On est tenté de prendre cet animal informe pour un produit fortuit de l'humidité et de la pourriture, pour un de ces jeux bizarres qui échappent à la Nature ; et on n'imagine pas comment cette mère commune, qui a réuni si souvent tant de belles proportions à tant de couleurs agréables, et qui même a donné aux grenouilles et aux raines une sorte de grâce, de gentillesse et de parure, a pu imprimer au crapaud une forme si hideuse. [...] Cet être ignoble occupe cependant une assez grande place dans le plan de la Nature : elle l'a répandu avec bien plus de profusion que beaucoup d'objets chéris de sa complaisance maternelle. Il semble qu'au physique, comme au moral, ce qui est le plus mauvais, est le plus facile à produire [...]."

Histoire Naturelle des Quadrupèdes Ovipares et des Serpens.  
Tome Premier. 1788. Bernard Germain De La Cépède

## 1.1.2 Où trouve-t-on les amphibiens ?

Les amphibiens sont présents de façon très large sur la planète, à l'exception des régions les plus polaires. Les anoues ont la répartition la plus large mais la majorité des espèces se trouve dans les forêts tropicales. Ils sont représentés depuis le niveau de la mer jusqu'à 4500 mètres d'altitude, aussi bien dans les zones humides que dans les régions semi-arides.

Les amphibiens dépendent le plus souvent des milieux humides. En effet, le stade de vie larvaire est totalement inféodé (sauf rares cas) au milieu aquatique (mares, cours d'eau, trous d'eau divers). Parmi les adultes, tous les cas existent : certains restent totalement aquatiques, d'autres restent à proximité des points d'eau et viennent uniquement pour s'y reproduire, d'autres encore deviennent totalement terrestres. Les adultes ont besoin d'humidité en raison de la perméabilité de leur peau. Ainsi, les espèces terrestres utilisent souvent des environnements humides. Les amphibiens ont cependant une grande résistance à la déshydratation et peuvent survivre après une importante perte d'eau. Les grenouilles arboricoles ont en plus la particularité de mieux retenir l'eau en raison de la plus faible perméabilité de leur peau. Pour éviter la déshydratation, certaines espèces se mettent à l'abri sous des roches, des souches ou des litières végétales et d'autres s'enterrent littéralement.

Les points d'eau utilisés pour la reproduction sont très variables suivant les espèces et même entre des populations d'une espèce. Les amphibiens utilisent principalement les milieux d'eau douce mais certaines espèces tolèrent les eaux saumâtres. De la même façon, on peut les trouver dans des eaux acides ou alcalines. Les larves sont observées dans des rivières et des ruisseaux, dans des lacs ou des mares et même dans des phytotelmes (minuscules pièces d'eau dans des troncs d'arbres, des broméliacées, à l'aisselle de feuilles...).

## 1.1.3 Quelle est la vie d'un amphibien ?

Le cycle de vie d'un amphibien se distingue par deux phases très différentes : la phase larvaire (aquatique) et la phase adulte (le plus souvent terrestre). Les éléments bien connus de la vie d'un amphibien sont ceux qui se passent dans l'eau : la vie larvaire et la reproduction des adultes. Ceci résulte de la plus grande facilité d'observation de ces phases. En effet, dans les zones tempérées, les adultes restent dissimulés (dans des cavités, sous des roches...) pendant les périodes froides. Ce type de période de ralentissement de l'activité se rencontre également pendant les périodes chaudes dans des zones plus arides, pour éviter une trop grande déshydratation. Ces moments de très faible activité rendent difficile l'étude du stade adulte, hors reproduction.

### 1.1.3.1 Ça se reproduit

Les amphibiens présentent la plus large gamme de modalités de reproduction parmi l'ensemble des vertébrés. Pour commencer, chez la plupart des urodèles (à l'exception des Cryptobranchioïdés et des Sirenidae), la fécondation est interne. Le mâle réalise une

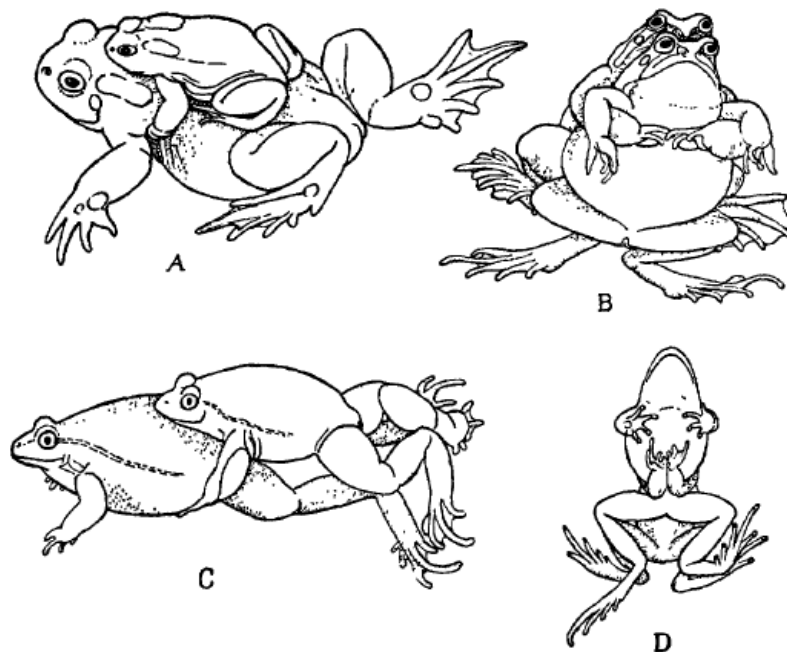


FIGURE 1.5 – Accouplement axillaire de *Bufo bufo* (A) et de *Rana arvalis* (B) et accouplement lombaire de *Discoglossus pictus* (C) et de *Pelodytes punctatus* (D) [Angel, 1946]

parade nuptiale autour de la femelle puis dépose sur le substrat un spermatophore qui sera aspiré par le cloaque de la femelle.

Chez les anoures, les mâles arrivent les premiers sur le lieu de ponte (principalement des pièces d'eau) et commencent à chanter pour attirer les femelles. Les chants sont spécifiques d'une espèce. Le coassement correspond à une expiration forcée, le plus souvent amplifiée par les sacs vocaux. Puis le mâle et la femelle s'accouplent en amplexus qui sera de deux types : axillaire (le mâle agrippe la femelle au niveau de la tête ou sous les aisselles, c'est le cas de tous les Neobatrachia) ou lombaire (le mâle s'agrippe à la taille de la femelle) (Figure 1.5). Le mâle se maintient en place grâce à des callosités nuptiales. Au contraire des urodèles, les anoures ont une reproduction exclusivement externe (à l'exception de quelques espèces tropicales). La femelle pond des œufs qui sont immédiatement fertilisés par le mâle fixé sur elle.

On peut aborder les diverses stratégies de reproduction des anoures sous plusieurs aspects : temporel, spatial, énergétique...

Premièrement, chez les anoures, la période de reproduction peut être plus ou moins ponctuelle : on parle de reproduction explosive (très réduite dans le temps avec synchronisation des individus) ou prolongée [Hartel et al., 2007]. Bien entendu, ces deux classes ne représentent que les extrêmes d'un continuum de cas rencontrés dans la nature. Les mâles ont plus facilement accès à plusieurs copulations dans le cas de reproduction prolongée que dans le cas de reproduction explosive. Dans cette dernière modalité, le succès repro-



ducteur des mâles est moins variable puisque les femelles arrivent de façon synchronisée pour se reproduire. Par ailleurs, le déclenchement de la période de reproduction et sa durée dépendent en grande partie de facteurs abiotiques (parmi ceux-ci la pluviométrie et la température) et de facteurs biotiques (dont la compétition, la prédation). Ainsi, au sein d'une même espèce, la date de reproduction peut varier selon la latitude. Les espèces tropicales et subtropicales, quant à elles, se reproduisent de façon plus ou moins continue pendant les périodes de pluie.

Pendant l'épisode de reproduction, on peut aussi distinguer trois stratégies, qui ne sont là encore pas exclusives : la compétition/bousculade, les chœurs/leks et la défense des ressources. Dans le premier cas (fréquent dans les reproductions explosives), les mâles arrivent sur le site avant les femelles. Ils sont souvent en surnombre et se bagarrent pour attraper tout ce qui passe à leur portée (les autres mâles, des individus d'autres espèces...) jusqu'à trouver une femelle [Reading and Clarke, 1983]. Il est fréquent qu'un mâle non apparié se joigne à un couple déjà formé et ceci peut aller jusqu'à former des agrégats d'une demi-douzaine d'individus. Ceci peut être fatal à la femelle, coincée au milieu de la mêlée. L'assemblage de plusieurs mâles sur une même femelle peut également mener à des cas de multipaternité de la ponte produite [Myers and Zamudio, 2004; Lode and Lesbarreres, 2004; Lode et al., 2005; Laurila and Seppa, 1998]. Le mâle premièrement accroché à la femelle fertilise alors la plus grande partie des œufs.

Dans le cas des chœurs et des leks, les mâles, réunis en grand nombre dans une mare, restent à un endroit précis, chantent pour attirer les femelles et défendent un micro-territoire [Broquet et al., 2008]. Les femelles choisissent alors un mâle, s'accouplent et vont pondre ailleurs dans la mare. Il n'y a quasi pas de bagarre entre mâles ou simplement pour défendre leur territoire.

Certaines espèces présentent une stratégie de défense des ressources : un mâle monopolise un site nécessaire à l'oviposition. Le choix de la femelle repose ici sur la qualité du territoire gardé par le mâle. Ce cas semble plus rare que les deux précédents.

Les espèces d'anoures à reproduction terrestre n'entrent dans aucune des trois catégories évoquées ci-dessus. Par exemple, chez l'Alyte accoucheur, *Alytes obstetricans*, la femelle vocalise (ce qui n'est pas commun chez les anoures) et après la fécondation, le mâle enroule les œufs fertilisés autour de ses pattes. Il les transporte ensuite plusieurs semaines avant de déposer les têtards à l'éclosion dans une mare.

Enfin, l'origine de l'énergie dépensée par les adultes pendant la reproduction varie selon les espèces [Lardner and Loman, 2003]. Certaines espèces sont des "income breeders" : ils se reproduisent s'ils trouvent ponctuellement un apport nutritif suffisant. D'autres espèces sont des "capital breeders" qui accumulent des réserves en vue de la reproduction. Cependant de nombreuses espèces ont des stratégies énergétiques mixtes [Jonsson et al., 2009].

### 1.1.3.2 Ça larve

Le plus souvent, le développement des larves d'amphibien se passe dans l'eau, depuis la ponte jusqu'à la métamorphose. Cependant, l'ovoviviparité (et même la viviparité) existe chez certaines espèces d'urodèles et chez de rares espèces d'anoures.

Les œufs d'amphibiens sont le plus souvent regroupés en une ponte, masse gélatineuse ou cordon, souvent attachée à un support. Certaines espèces déposent des œufs isolés (c'est le cas des tritons). La forme de la ponte, la taille, l'aspect des œufs permettent parfois d'identifier l'espèce.

À l'éclosion, l'individu produit est une larve qui devra subir une métamorphose pour devenir un juvénile, forme sexuellement immature, ressemblant à l'adulte de la même espèce (Figure 1.6) :

"Vous n'êtes pas sans avoir vu fréquemment dans les mares, où ils abondent à certaines époques de l'année, ces petits du crapaud et de la grenouille : Une sorte de boule noire ou grise, terminée par une longue queue comprimée, le tout frétilant et nageant avec facilité ; c'est le têtard. Les père et mère ont quatre pattes ; leur petit n'en a pas. Ils n'ont pas de queue ; il en a une fort longue. Ils ont des yeux ; il est aveugle. Ils ont une très grande bouche ; sa bouche n'est qu'un petit trou. Ils sont terrestres autant qu'aquatiques, quand ils ne sont pas exclusivement terrestres ; il est exclusivement aquatique. Ils sont carnassiers ; il est herbivore. Ils ont un intestin très court ; il a un intestin très long. Ils respirent dans l'air au moyen de poumons, comme les reptiles, les oiseaux et les mammifères ; il respire dans l'eau au moyen de branchies comme les poissons. Ils ont un cœur de reptile ; il a un cœur de poisson. En un mot, la grenouille et le crapaud sont des reptiles, le têtard est un poisson. La grenouille et le crapaud, reptiles, donnent naissance à un poisson, et ce poisson, montant en grade, finit par devenir un reptile."

Les animaux à métamorphose, 1876, Victor Meunier.

Ce texte du 19<sup>e</sup> siècle aborde de façon frontale le problème du développement larvaire aquatique des anoues et des modifications nécessaires avant d'atteindre l'état adulte terrestre (même si les têtards comme les adultes ne sont ni poissons ni reptiles mais bien anoues ou amphibiens). La métamorphose des urodèles est moins sévère : les larves à l'éclosion ressemblent à de minuscules adultes (ils ont déjà des pattes arrière et un balancier au niveau de la tête, avant l'apparition rapide des pattes avant, ils sont carnivores comme l'adulte) (Figure 1.7). De nombreuses espèces aquatiques d'urodèles présentent une néoténie. Ce phénomène décrit des organismes capables de se reproduire en conservant des caractères larvaires. Certaines espèces présentent des néotènes facultatifs : ceci signifie qu'ils peuvent atteindre un état adulte total sous certaines conditions (c'est le cas bien connu de l'axolotl, forme néotène de l'ambystome *Ambystoma mexicanum*). D'autres espèces sont des néotènes obligatoires, qui ne présentent jamais d'adulte vrai (comme pour le protéé anguillard, *Proteus anguinus*).

Chez les anoues, la larve est un stade sensible à l'assèchement du milieu et aussi à la prédation par des invertébrés aquatiques, des urodèles, des poissons, des oiseaux,

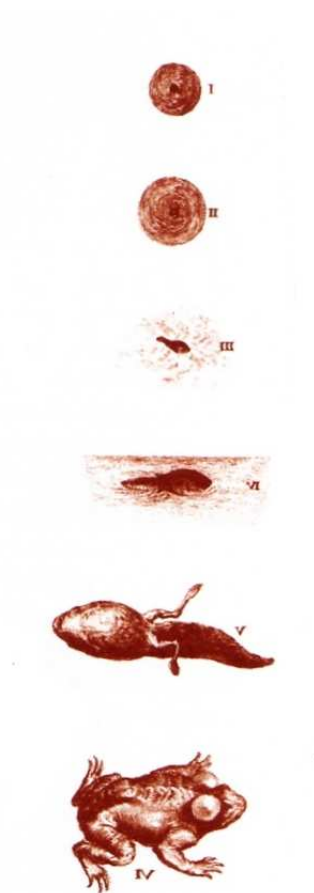


FIGURE 1.6 – Métamorphose d'un anoure (issu de [Recoura, 2007])

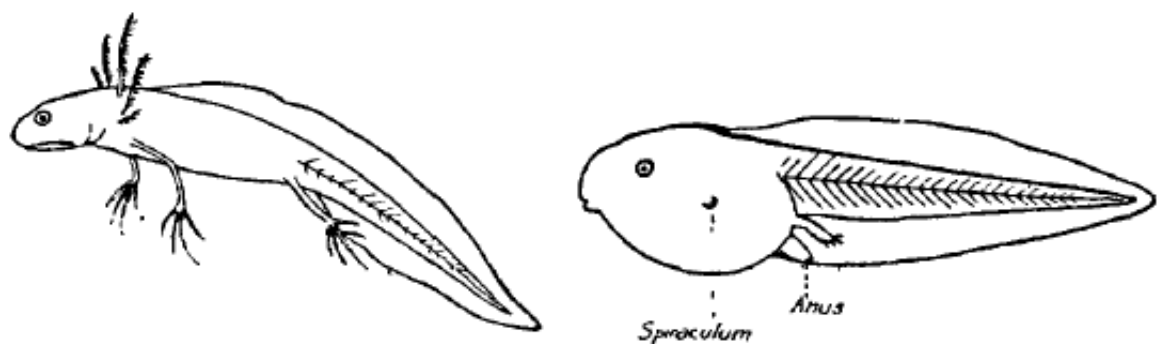


FIGURE 1.7 – Larves d'urodèle (gauche) et d'anoure (droite) [Angel, 1946]

des serpents. . . La survie larvaire (entre l'œuf et le juvénile) est très faible : Beebee rapporte des valeurs comprises entre 0.2 et 6% sur cinq espèces d'amphibiens [Beebee, 1996]. Après éclosion, la larve vit quelques jours sur ses réserves, le vitellus. Elle respire par des branchies externes qui seront remplacées par des branchies internes, enfermées dans une chambre branchiale et communiquant avec l'extérieur par le spiracle. Simultanément, l'intestin devient fonctionnel, il est adapté à une nutrition principalement herbivore et détritivore. Cette période correspond à la pré-métamorphose. Ensuite, les pattes arrière apparaissent lors de la pro-métamorphose [Brown and Cai, 2007]. Cette phase est induite par l'augmentation de la concentration d'hormones thyroïdiennes circulantes. Les changements deviennent drastiques lors de la post-métamorphose ou climax : mise en place des quatre membres, remodelage du squelette, de la musculature, du système nerveux, mise en place de poumons fonctionnels, réduction de l'intestin (pour passer à un mode carnivore), modification des glandes digestives, des reins, du système vasculaire, de la peau et finalement disparition de la queue. A la fin de la métamorphose, les juvéniles quittent les mares.

Pour étudier de façon standardisée la différenciation larvaire, des tables ont été élaborées et elle définissent des stades larvaires associés à des caractéristiques de développement. Chez les anoures, la table la plus utilisée actuellement est celle établie par Gosner (Figure 1.8, [Gosner, 1960], après celle de Taylor et Kollros [Taylor and Kollros, 1946]).

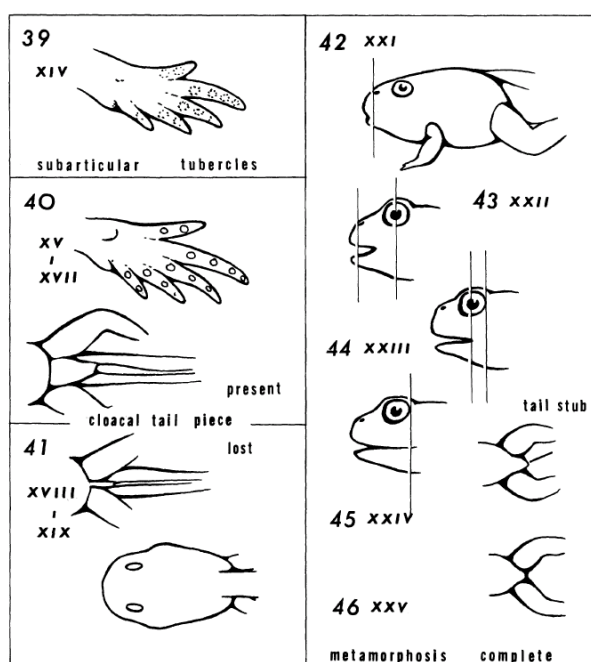


FIGURE 1.8 – Derniers stades avant la métamorphose d'après la table de Gosner [Gosner, 1960]

### 1.1.3.3 Ça mature sexuellement

Entre la fin de la métamorphose et la reproduction, la vie des amphibiens est assez mal connue, étant difficile d'accès. La survie estimée par année est de 10 à 80% selon les espèces [Beebee, 1996]. Les espèces présentant des sécrétions cutanées toxiques semblent avoir une survie plus importante même si un grand nombre de prédateurs semblent capables d'éviscérer les amphibiens toxiques en laissant la peau de côté. Les prédateurs des amphibiens sont nombreux : mammifères de toutes tailles (du lion à la musaraigne), les reptiles (en particulier les serpents, cf citation ci-dessous), certaines espèces de poissons. Les infections et la mortalité liée à des conditions environnementales extrêmes entrent également en compte.

"La petite grenouille a peur du serpent. En voilà un qui approche. Et vite, la petite grenouille prend un bâton dans sa bouche. De cette façon elle est trop large pour la gueule du serpent, il ne pourra pas l'avaler"

Ruse de Grenouille, *Symbolorum et emblematum ex aquatilibus et reptilibus*,  
Joachim Camerarius, 1604

La maturité sexuelle est acquise en quelques mois ou plusieurs années, suivant les espèces. La phase juvénile est souvent considérée comme la phase de dispersion [Smith and Green, 2005; Sinsch, 1997]. Cependant, beaucoup d'espèces montrent une grande fidélité à leur site de naissance et viennent s'y reproduire [Sinsch, 1992; Miaud et al., 2000b]. Certaines espèces d'amphibiens ont une grande capacité de migration (jusqu'à plus de 30 kilomètres) [Smith and Green, 2006].

## 1.2 "Parce que le global change !" ... approche évolutive

Première remarque sur ce chapitre : le titre est à lire en bilingue (petit exercice destiné à tenir éveillé le lecteur). On lira donc en anglais "global change" et le reste en français. Il est de bon goût actuellement de dire que nos recherches sont utiles et que nous contribuerons à sauver la planète (rien de moins !). Ainsi la majorité de nos recherches semblent répondre au même questionnement : les changements globaux et leur impact sur les populations, espèces, écosystèmes, planète (sans S). Ayant moi-même participé à cette douce hypocrisie, je n'ai pas cherché à éviter ce raccourci facile dans mon manuscrit de thèse. Il faut tout de même préciser que l'ensemble des questions évolutives abordées dans cette thèse peuvent être justifiées sans aborder le problème des changements globaux.

Ceci étant dit, ce chapitre s'efforcera de poser le contexte évolutif propre à ce travail. A travers l'impact des changements globaux, j'exposerai les phénomènes évolutifs étudiés : évolution des **traits d'histoire de vie**, adaptation locale, plasticité phénotypique, **consanguinité**, différenciation génétique... Je n'ai pas l'ambition de faire un cours complet d'écologie évolutive. Beaucoup d'autres l'ont déjà fait avec élégance. J'aborderai donc uniquement les aspects nécessaires à la compréhension de ce travail sur le Pélodyte ponctué et je tenterai de faire le point sur ce qui est déjà connu de façon générale sur les problématiques abordées.

### 1.2.1 Quels sont les changements globaux ?

Les changements globaux s'observent à l'échelle de toute la planète (comme leur nom l'indique) et comprennent des changements climatiques (les plus médiatisés en ce moment) mais aussi des changements des milieux dus à l'anthropisation croissante. Les changements climatiques sont une augmentation des températures (qui s'observe depuis les dernières décennies du 20<sup>e</sup> siècle) accompagnée par des modifications du régime de précipitations (par exemple, augmentation en Europe du Nord mais baisse en Méditerranée). L'anthropisation des milieux se traduit notamment par une plus grande fragmentation (voire une disparition) de l'habitat de certaines espèces, une augmentation de la pollution (accompagnée d'une acidification) des milieux et l'introduction de nouvelles espèces qui modifient l'environnement des espèces natives.

L'ensemble de ces modifications est susceptible de toucher (ou a déjà touché) les populations d'amphibiens [Hopkins, 2007]. De plus, presque 2000 espèces d'amphibiens sont en déclin (source AmphibiaWeb) et plusieurs centaines sont menacées d'extinction ou ont déjà disparu [Stuart et al., 2004]. Cependant, il n'est pas toujours évident de démontrer un lien de causalité entre les changements globaux et le déclin d'une espèce [Blaustein et al., 2001; Carey and Alexander, 2003; Cushman, 2006].

## 1.2.2 Comment survivre aux changements globaux ?

Une espèce a plusieurs solutions pour persister face aux changements globaux : elle peut modifier son environnement local, montrer de la plasticité phénotypique, suivre son habitat ou évoluer génétiquement [Walther et al., 2002; Parmesan, 2006]. La modification de l'environnement par un organisme peut être vue comme l'ensemble des comportements qui isolent, en quelque sorte, l'individu de son environnement : un exemple typique est la construction de nids ou d'abris. La plasticité phénotypique correspond à des variations de **phénotypes** en réponse à des changements du milieu, sans aucune modification du **génotype** [Charmantier et al., 2008]. La modification de l'environnement et la plasticité phénotypique ne permettent de résister à des changements (à l'échelle des individus) que dans une certaine gamme.

Suivre son habitat ("Habitat tracking") correspond à se déplacer pour garder des conditions environnementales favorables : ceci aboutit à des modifications d'aire de distribution des espèces [Perry et al., 2005]. Ce phénomène est observé à toutes les échelles temporelles : migration saisonnière des oiseaux ou aires refuge pendant les glaciations [Holman, 1993]. La microévolution consiste en des changements génétiques (à l'échelle des populations). "Habitat tracking" ou microévolution nécessitent d'évoluer suffisamment vite par rapport au rythme des changements environnementaux pour résister. Je reviens en détail sur les phénomènes de microévolution et de plasticité phénotypique dans la suite de cette section.

## 1.2.3 Microévolution

Lorsqu'on s'intéresse aux changements évolutifs qui surviennent à l'échelle des générations, on parle de microévolution (par opposition à la macroévolution qui agit sur des échelles de temps géologique). L'évolution a pour socle l'hérédité qui assure la transmission des caractères de génération en génération, la variabilité (et les phénomènes qui la maintiennent), la sélection naturelle et la **dérive** génétique. L'hérédité transmet les **génotypes** (et la **recombinaison** due à la reproduction sexuée les mélange). Cette transmission est fidèle à la mutation près. La variabilité génétique peut induire une variabilité phénotypique via l'expression des gènes. C'est sur ce niveau de variabilité que s'exerce le filtre de la sélection naturelle. Celle-ci consiste à trier des **phénotypes** pour ne garder que les meilleurs (en terme de survie et de capacité à générer des descendants viables et fertiles) dans un environnement donné. Un autre type de tri s'opère par un processus purement aléatoire, c'est la **dérive**.

La variabilité génétique, créée par mutation, est triée par sélection naturelle ou par la **dérive** au sein d'un ensemble donné. L'unité fonctionnelle est ici la population. C'est dans une population que les fréquences alléliques peuvent varier. Ainsi d'une population à l'autre, les fréquences des **génotypes** peuvent être différentes. Les flux de gènes existant entre des populations (via la migration des individus) vont jouer un rôle dans l'évolution génétique de chacune des populations.

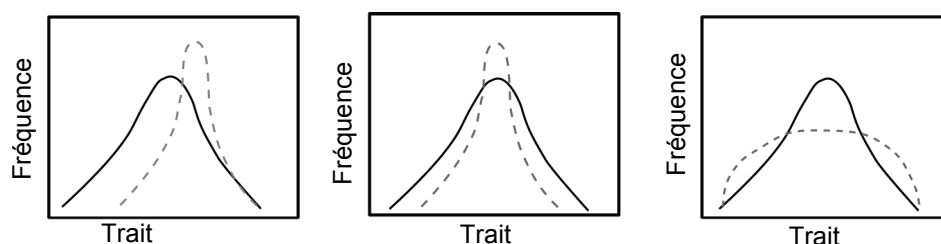


FIGURE 1.9 – Régimes de sélection : sélection directionnelle, stabilisante et divergente (de gauche à droite). La distribution en trait noir plein est la distribution d'origine et celle en trait gris pointillé est la distribution obtenue après sélection.

Quand l'environnement change, on peut s'attendre à des changements sur une grande partie des mécanismes cités ci-dessus : la sélection naturelle, la **dérive** et la migration.

### 1.2.3.1 Sélection naturelle et adaptation locale

La sélection naturelle conserve les individus (c'est à dire également les **génotypes**) les plus aptes dans un certain contexte. On peut définir quatre types de sélection en fonction de leur action sur le trait considéré (Figure 1.9) : la sélection directionnelle qui augmente ou diminue la moyenne du trait (en favorisant les **phénotypes** situés à un extrême ou l'autre de la distribution) ; la sélection stabilisante qui diminue la variance du trait (en favorisant les **phénotypes** intermédiaires) ; la sélection divergente et la sélection disruptive qui augmentent la variance du trait (en favorisant les **phénotypes** extrêmes) [Brodie et al., 1995]. La sélection disruptive intervient lorsque deux optima existent dans un contexte donné et que les individus partent tous du même point. Elle est à l'origine de la spéciation sympatrique (production de deux espèces à partir d'une population d'individus partageant le même environnement). Au contraire, la sélection divergente concerne des populations vivant dans des environnements différents (qui ne partent pas du même point) et ceci mènera plutôt à de la spéciation parapatricque.

La sélection divergente a de grandes chances d'être observée dans des environnements contrastés et aboutir à un phénomène appelé adaptation locale. Ainsi chaque population locale va évoluer vers des traits lui fournissant un avantage pour l'environnement dans lequel elle se trouve. L'adaptation locale permet le maintien de la variation génétique entre des populations utilisant des environnements différents. Elle aboutit à des **phénotypes** spécialisés, bien adaptés à leur environnement mais moins à un autre environnement. Cette caractéristique est à la base des tests d'adaptation locale : on attend que lors d'une expérience de transplantation, dans un environnement donné, la population locale ait une **fitness** plus importante que les autres populations (test "local/étranger") et que chaque population montre une **fitness** plus grande dans son propre habitat (test "chez-soi/ailleurs") [Kawecki and Ebert, 2004].

Les facteurs optimisant l'adaptation locale sont un flux de gènes réduit, peu de variation temporelle des forces sélectives, peu de plasticité phénotypique. Dans des environne-



ments fragmentés, les flux de gènes vont fortement contrer les forces sélectives en présence en induisant de la maladaptation [Lenormand, 2002]. Cependant un flux de gènes trop faible réduit fortement la variabilité génétique par **dérive** (comme expliqué ci-dessous) et limite également l'adaptation [Alleaume-Benharira et al., 2006]. Finalement, les changements climatiques, en induisant des modifications temporelles des environnements et donc de la sélection naturelle, auront tendance à diminuer l'adaptation locale des populations [Leimar, 2005].

### 1.2.3.2 Effets de la fragmentation sur l'évolution des populations

Nous avons vu ci-dessus que la fragmentation de l'habitat peut potentiellement mener à une adaptation locale plus importante, c'est à dire à des contrastes génétiques plus marqués entre les populations. En soi, ça paraît bénin. On pourrait même considérer que c'est plutôt chouette pour la biodiversité puisque ça augmente les contrastes. Cependant, la fragmentation a tendance à s'accompagner de réduction des tailles de populations [Dudash and Fenster, 2000]. Ceci a pour effet direct d'augmenter à la fois la **dérive** et la **consanguinité**.

Détaillons. La connectivité des populations même si elle s'oppose à l'adaptation locale, permet d'augmenter les chances de survie d'une population. Ceci est d'autant plus vrai lorsqu'on se place dans le contexte de métapopulation. Une métapopulation est, comme son nom l'indique, un ensemble de populations locales, échangeant des gènes entre elles via des migrants [Pulliam, 1988]. Dans une métapopulation, il y a des populations source (celles dont le bilan migratoire à l'équilibre est négatif) et des populations puits (celles en recette migratoire). Ainsi la fragmentation des habitats a tendance à réduire les possibilités de migration et donc de sauvetage entre populations. Ceci a pour effet d'augmenter la probabilité d'extinction et donc de réduire la **taille efficace** des populations.

Les petites populations sont également plus soumises aux phénomènes de **dérive**. La **dérive** est un processus d'échantillonnage aléatoire des individus qui produit des modifications dans les fréquences des allèles, au sein d'une population, indépendamment des mutations, des migrations et de la sélection naturelle. Plus l'effectif dans lequel ce tirage est effectué est restreint, plus la **dérive** sera forte. La **dérive** finit toujours par provoquer la fixation d'un allèle et ainsi diminuer la variabilité génétique observée dans une population. La **dérive** augmente donc l'appauvrissement génétique des petites populations.

De plus, dans des petites populations, le nombre d'individus participant à la reproduction est nécessairement faible ce qui entraîne de plus grands risques de se reproduire avec un apparenté. Ceci provoque de la **consanguinité**. Ce phénomène est connu dans les sociétés humaines et est même fréquemment limité par des lois. En effet, la **consanguinité** peut engendrer des baisses de **fitness** : c'est la dépression de consanguinité. Une étude récente a ainsi montré que des femmes consanguines d'un petit village isolé en Suisse avaient moins d'enfants que des individus non consanguins (Postma et al, JEB, 2010).

La dépression de consanguinité est due au fait que les parents d'un individu consanguin, se ressemblant plus que la normale, ont plus de chance de transmettre des allèles identiques d'un gène donné. Ainsi un individu consanguin a un taux d'homozygotie élevé. Les problèmes peuvent résulter de la mise à l'état homozygote d'allèles délétères. Les allèles délétères sont présents en faible quantité dans une population et ces allèles sont le plus souvent récessifs, ne s'exprimant qu'à l'état homozygote. L'autre phénomène expliquant la dépression de consanguinité est la superdominance qui fait que les individus hétérozygotes sont toujours meilleurs que les homozygotes [Charlesworth and Willis, 2009].

Notons que le phénomène inverse de la dépression de consanguinité se nomme hétérosis. L'hétérosis résulte du croisement de deux individus génétiquement distants produisant un individu hybride. On observe que ces hybrides présentent une valeur sélective plus grande. Un troisième phénomène du même type existe, il s'agit de la dépression hybride. Dans ce dernier cas, les individus issus de croisements entre individus issus de populations différentes, montrant donc une hétérozygotie élevée, ont une **fitness** moins élevée que celle de leurs parents. Ce phénomène s'explique par l'existence d'adaptation locale entre les populations des deux parents. Ainsi le **génotype** transmis par un des deux parents (le migrant) est maladapté à l'environnement où vit le descendant. L'autre explication repose sur le fait que les **génotypes** à l'intérieur d'une population présentent une coadaptation fonctionnelle. Par exemple, deux gènes peuvent fonctionner de façon optimale lorsqu'ils sont ensemble et potentiellement sous des formes alléliques données. Alors le croisement entre deux individus de populations différentes rompt les complexes géniques coadaptés [Lynch, 1991].

## 1.2.4 Plasticité phénotypique

### 1.2.4.1 Définitions

La plasticité phénotypique peut se définir comme la capacité d'un **génotype** à produire une gamme de **phénotypes** différents dans divers environnements [Stearns, 1989]. Ce phénomène permet l'**adaptation** dans des environnements hétérogènes.

Tous les systèmes chimiques sont sensibles notamment à la température, la pression, le pH et la concentration des substrats. Ainsi tout organisme qui perçoit (ou subit) les changements de son environnement va inévitablement présenter de la plasticité phénotypique.

Cependant, une réponse plastique peut être adaptative ou pas [Via et al., 1995]. Une réponse maladaptative est fréquemment observée lorsque l'organisme est mis dans des conditions environnementales inhabituelles [Stearns, 1989]. Si un organisme produit toujours le même **phénotype** pour un trait donné, quelles que soient les variations de l'environnement, on parle alors de canalisation du trait en question [Debat and David, 2001].

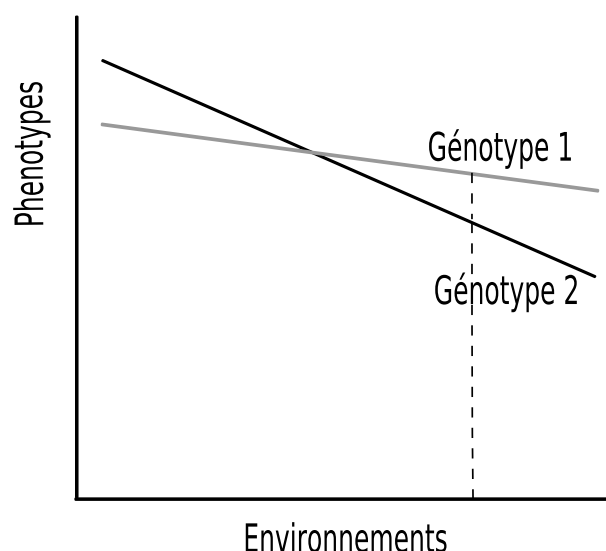


FIGURE 1.10 – Normes de réaction de deux génotypes, mesurées par les phénotypes produits dans une série d'environnements

Dans le contexte de la plasticité phénotypique, on définit la norme de réaction : c'est la relation entre les valeurs phénotypiques exprimées par un **génotype** et les environnements qui les induisent (Figure 1.10, [Stearns, 1989; Via et al., 1995]). Ce concept a été nommé par Woltereck en 1909 (à partir d'une expérience sur l'effet de l'alimentation sur la carapace des daphnies) alors que le terme plasticité phénotypique n'existait pas encore (il est proposé par Nilsson-Ehle en 1914 à propos de l'**adaptation** des plantes alpines aux basses altitudes). Une norme de réaction peut être réversible ou irréversible selon si un retour en arrière est ou n'est pas possible une fois le **phénotype** exprimé dans un organisme donné.

Parmi les cas de plasticité phénotypique adaptative, deux grandes catégories ont été abondamment étudiées : les réponses aux changements de régime alimentaire (induite par les proies) et les réponses aux changements de risques (induites par les prédateurs). Dans la première catégorie une étude célèbre est celle de Meyer en 1987 qui a montré des changements réversibles de la morphologie de la mâchoire chez des poissons cichlidés en réponse à des changements de menus [Meyer, 1987]. La deuxième catégorie comprend de nombreuses études sur les larves d'amphibiens montrant des modifications de morphologie induites par la présence d'un prédateur (le plus souvent un invertébré aquatique) [Lardner, ; Reques and Tejedo, 1997; Richter-Boix et al., 2004]. Dans ces exemples chez les larves, la modification est irréversible puisqu'il n'est pas possible de revivre le développement larvaire.

### 1.2.4.2 Évolution de la plasticité

La plasticité phénotypique n'est pas totalement dissociée de la microévolution puisque la plasticité peut elle-même évoluer. En effet, il y a des déterminants génétiques à la plasticité et s'il existe des variations héritables de la plasticité d'un trait donné, alors la plasticité de ce trait peut changer au fil des générations (par exemple, **héritabilité** des défenses induites chez des têtards, [Relyea, 2005]).

On peut définir un certain nombre de coûts associés à la plasticité phénotypique qui permettent d'expliquer pourquoi tous les traits ne sont pas infiniment plastiques [DeWitt et al., 1998; Relyea, 2002]. Le coût le plus évident est celui de la production de la réponse plastique. Il y a aussi un coût lié à l'identification du signal (issu de l'environnement) afin d'induire une réponse. Les coûts génétiques s'expliquent notamment par les phénomènes de **pléiotropie** (un gène bénéfique pour la plasticité d'un trait peut être négatif pour un autre trait) ou d'**épistasie** (l'effet d'un gène peut dépendre d'un autre gène). Enfin, les coûts de l'instabilité du développement résultent de l'idée que pendant le développement un organisme doit être relativement insensible aux modifications de l'environnement pour produire le **phénotype** convenable [Waddington, 1942]. En étudiant les coûts de la plasticité morphologique induite par la prédation chez des larves de grenouilles, Relyea montre que des individus montrant une plus grande plasticité pour un trait peuvent avoir une augmentation ou une réduction de leur **fitness** suivant l'environnement (et également selon le trait étudié) [Relyea, 2002]. Dans cette même étude, une plus grande plasticité n'induit pas d'instabilité de développement. Ainsi, les coûts de la plasticité phénotypiques ne sont pas toujours très clairs selon les conditions, les espèces et les traits considérés [DeWitt et al., 1998].

### 1.2.4.3 Plasticité chez les amphibiens

Chez les amphibiens, les principaux traits étudiés sous l'angle de la plasticité phénotypique sont les traits larvaires : le temps de développement embryonnaire, le temps de développement larvaire, la croissance larvaire, les changements de morphologie. Les variations environnementales provoquant la plasticité chez ces espèces sont principalement la température (cf citation ci-dessous et [Smith-Gill and Berven, 1979]), la nourriture, le pH, l'assèchement de la mare, la compétition et la prédation [Baker and Beebee, 2000; Blouin and Brown, 2000; Loman, 2001; Newman, 1998; Reques and Tejedo, 1997; Voss, ].

"Ajoutons ce qu'il est important de savoir, que diverses circonstances, - on s'en est assuré par l'expérience, - peuvent prolonger ou abréger considérablement la durée de l'état du têtard; et telles sont en particulier le défaut ou l'excès de lumière et de la chaleur"

Les animaux à métamorphose, 1876, Victor Meunier.

La plasticité de la phénologie de reproduction est également bien connue chez les amphibiens. Il a ainsi été montré que la date de migration vers les lieux de pontes ou la date de reproduction sont souvent influencées par des variations climatiques (température et

pluviométrie) [Gibbs and Breisch, 2001; Reading, 2003; Reading, 1998].

#### 1.2.4.4 Cas particulier de plasticité : les stratégies bet-hedging.

Commençons par une petite traduction : en français on devrait parler de stratégie de minimisation (ou d'étalement) des risques. Pour plus de concision et parce que cette périphrase n'est quasi jamais utilisée parmi les biologistes évolutifs francophones, j'utiliserai directement le terme de **bet-hedging** ou stratégie **bet-hedging** dans la suite du paragraphe.

Il n'est pas très simple de définir le **bet-hedging** puisque les avis des spécialistes continuent de diverger sur cette question. On peut commencer par dire qu'il s'agit d'une forme de plasticité phénotypique aléatoire, correspondant à un "choix" aléatoire du **phénotype** avant même d'avoir expérimenté les contraintes environnementales. C'est le côté aléatoire du **bet-hedging** qui est vraiment important.

Les conditions favorisant l'émergence de stratégies **bet-hedging** sont donc un environnement variable dans le temps et surtout imprévisible (les variations temporelles de l'environnement doivent être aléatoires) [Oloffson et al., 2009]. Lorsque les conditions sont prédictibles, il a été montré que les stratégies pures sont toujours meilleures que les stratégies mixtes [Bishop and Cannings, 1976]. De même, des environnements variables uniquement dans l'espace ont tendance à promouvoir du polymorphisme génétique (donc plutôt des stratégies spécialistes) [Leimar, 2005].

Lorsque la **fitness** d'un individu ou d'un **génotype** varie dans le temps, on calcule la **fitness** à long-terme par sa moyenne géométrique (et non arithmétique) à travers les différentes générations produites par le **génotype**. Or une moyenne géométrique aura tendance à augmenter si la variance diminue (contrairement à la moyenne arithmétique qui est insensible à la variance). La stratégie **bet-hedging** tend à diminuer la variance temporelle de la **fitness** ce qui augmente sa moyenne géométrique mais réduit sa moyenne arithmétique. Par exemple, Fox et Rauter montrent que la moyenne géométrique de la **fitness** à travers les générations est plus élevée lors d'accouplements multiples chez les femelles, ils proposent donc que l'évolution de cette stratégie s'explique par du **bet-hedging** [Fox and Rauter, 2003].

Dans ce contexte, trois types de stratégie **bet-hedging** ont été définis [Philippi and Seger, 1989; Oloffson et al., 2009] une stratégie conservative, une diversifiée et une stratégie roulette russe (je ne connais pas de traduction française de la version anglaise de cette dernière stratégie "adaptive coin flipping"). La stratégie conservative peut se traduire par le dicton "un tiens vaut mieux que deux tu l'auras" (ou "play it safe" en anglais) et consiste à éviter les extrêmes pour minimiser la variance de la **fitness** (ou selon d'autres auteurs à utiliser toujours la même stratégie à bas risque...j'ai tendance à penser que ce n'est pas du **bet-hedging**). La stratégie diversifiée est illustrée par l'expression "ne pas mettre tous ses œufs dans le même panier" : il s'agit d'investir dans plusieurs stratégies

à la fois pour éviter de choisir uniquement la stratégie perdante. La dernière stratégie consiste à choisir à un moment donné une stratégie de façon aléatoire et de réitérer ce même choix aléatoire à l'occasion suivante (de façon stricte, il n'y a pas de variance à l'intérieur d'un événement mais juste entre les événements).

La première proposition de modèle de stratégie **bet-hedging** diversifiée était faite par Cohen [Cohen, 1970] et concernait la germination de plantes annuelles dans le désert : elle reposait sur l'idée qu'une graine qui germe risque d'avoir choisi la mauvaise année mais une graine qui ne germe pas court un risque de mortalité pendant la dormance ainsi un même **génotype** produisait à la fois des graines qui germent rapidement et des graines qui restent en dormance. Plus récemment, Saiah et Perrin ont montré que des petits crustacés d'eau douce, adaptés aux mares temporaires, pouvaient (à partir des mêmes pools d'œufs) éclore en automne ou au printemps suivant [Saiah and Perrin, 1990]. En automne, le risque de mortalité pendant l'hiver est important mais si les individus survivent, ils atteignent une plus grande taille adulte et une meilleure fécondité que les individus éclos au printemps.

Dans un article récent, Olofsson et ses collègues ont montré qu'un organisme longévif (et itéropare) a plus de chance de présenter une stratégie de type roulette russe et que la stratégie optimale (sans hypothèse sur la longévité de l'organisme) est une combinaison des trois stratégies proposées ci-dessus [Olofsson et al., 2009].

J'espère être parvenue à expliquer de façon la plus claire possible les éléments de biologie évolutive nécessaires pour comprendre mon travail de thèse. Il me reste à présent à démontrer comment ces questions évolutives prennent du sens dans le cas particulier de la vie du Pélodyte.



FIGURE 1.11 – Couple de Pélodytes ponctués (photo P. Geniez)

## 1.3 Mais qui est donc le Pélodyte ?

Puisque le monde des amphibiens n'a plus de secret pour vous et que vous maîtrisez les aspects de biologie évolutive nécessaires, il est temps de présenter l'acteur principal de cette aventure scientifique : le Pélodyte ponctué. Dans les prochaines lignes, pour plus de concision, j'utiliserai souvent le terme Pélodyte sans préciser qu'il s'agit du Pélodyte ponctué. Toute référence à une autre espèce du genre *Pelodytes* sera par contre précisée.

### 1.3.1 À quoi ressemble le Pélodyte ?

C'est un animal charmant (en toute objectivité, voir Figure 1.11). Plus précisément, c'est un petit anoure de 4cm environ (les femelles sont plus grandes que les mâles). Il a un corps svelte pourvu de petites verrues (bon, moins charmant ...). Il a un museau arrondi, des yeux proéminents et des pupilles verticales, en forme de goutte. Son corps est de couleur variable, souvent claire (dans les tons gris verts) parsemé de petites tâches vert foncé (d'où le nom de ponctué et en anglais "persillé", Parsley frog). La peau du ventre est très pâle. Le mâle se distingue aisément de la femelle par la présence de callosités nuptiales brun foncé sur les deux premiers doigts, le bras, l'avant-bras et la poitrine.

On peut également facilement l'identifier à son chant (pour les mâles) qui ressemble (au choix) : au " crissement du bouchon qu'on retire d'une bouteille " [Pages, 1979], à un "grincement de chaussure " [Thomas et al., 2003] ou à "deux boules de pétanque qui rebondissent rapidement l'une sur l'autre" [Acemav et al., 2003]. Cette dernière description me semble plus proche de la réalité. Les adultes sont visibles principalement lors des périodes de reproduction et ils restent peu autour des mares. Ainsi, on voit plus souvent les pontes ou les têtards de Pélodyte que les adultes.

Les pontes sont faciles à identifier : elles sont le plus souvent fixées sur des supports végétaux et mesurent de 2 à 20 cm de long. Le chapelet d'œufs semble entourer la ponte mais est en réalité disposé alternativement de droite à gauche du support. Les œufs sont petits (1 à 1.5 mm de diamètre), bicolores au début du développement avec un pôle animal noirâtre et un pôle végétatif blanc [Guyetant et al., 1999]. Le têtard est un peu



FIGURE 1.12 – Bouche de têtard de Pélodyte ponctué [Angel, 1946]

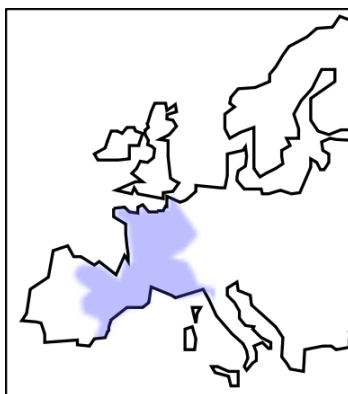


FIGURE 1.13 – Aire de distribution du Pélodyte ponctué

plus difficile à identifier. Il est de couleur plutôt foncée, ses yeux sont rapprochés, son spiracle s'ouvre sur le côté gauche et l'anus est médian. On distingue un fin maillage de légères lignes foncées au niveau de la queue. Celle-ci s'insère assez haut sur le corps. On identifie aussi le têtard de Pélodyte grâce à sa bouche et ses dents (Figure 1.12).

### 1.3.2 Répartition du Pélodyte

Le Pélodyte ponctué a son aire de répartition centrée sur la France (Figure 1.13). Il est présent dans la Péninsule ibérique (en Espagne uniquement car au sud du Portugal et en Andalousie, il s'agit du Pélodyte ibérique, *Pelodytes ibericus*, une espèce à part), dans toute la France ainsi que dans le Nord de l'Italie. On le trouve du niveau de la mer jusqu'à 2000 mètres (cas rare, plus fréquemment jusqu'à 1200 mètres). Il habite des régions ouvertes (plateaux calcaires, plaines marneuses ou sablonneuses) et supporte les eaux saumâtres. Les biotopes de ponte sont des mares ou des petits étangs, des ruisseaux à faible débit (et offrant en période de sécheresse des trous d'eau), des fossés, des prairies inondées ou même des sources [Guyétant et al., 1999]. En dehors des périodes de reproduction, les adultes peuvent demeurer à distance des points d'eau. On les observe parfois dans des cavités souterraines, sous des roches, dans des souches (refuges frais et humides).



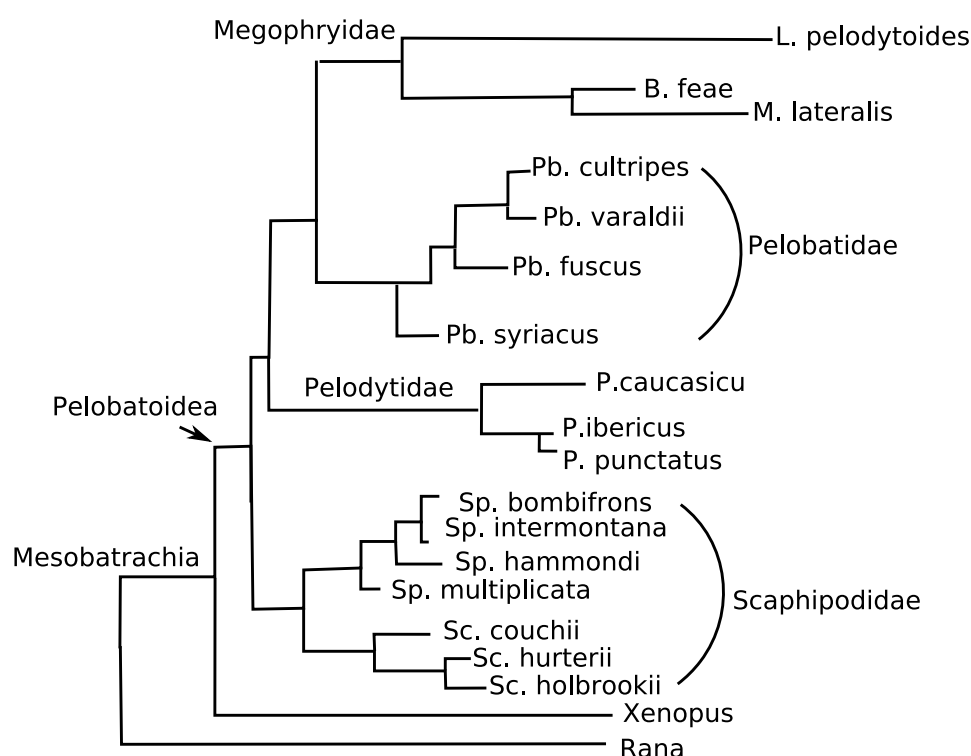


FIGURE 1.14 – Phylogénie des Pélobatidae d'après [Garcia-Paris et al., 2003]

En région méditerranéenne, le Pélodyte utilise préférentiellement des sites temporaires et même éphémères [Richter-Boix et al., 2007c]. En raison du fort taux de destruction de ces habitats, le Pélodyte a un taux d'extinction/colonisation élevé par rapport aux autres espèces d'anoures méditerranéens (à l'exception de *Bufo calamita* qui utilise le même type de milieu) [Richter-Boix, 2005].

### 1.3.3 Position phylogénétique du Pélodyte

Le Pélodyte ponctué appartient aux groupes des Pelobatoidea. Les Pelobatoidea regroupent les familles suivantes : Scaphiopodidae (Amérique du Nord), Megophryidae (Asie), Pelobatidae et Pelodytidae [Garcia-Paris et al., 2003]. Cette dernière famille comprend le Pélodyte ponctué, le Pélodyte ibérique et le Pélodyte du Caucase (*Pelodytes caucasicus*). Le Pélodyte du Caucase se place à la base des deux autres espèces. La disjonction entre *P. caucasicus* et *ibericus/punctatus* date du milieu du Miocène, il y a environ 14 millions d'années. Elle se serait faite par extinction successive des populations intermédiaires entre le Caucase et la péninsule ibérique. La différenciation *ibericus/punctatus* s'est effectuée plus récemment, il y a 3.6 millions d'années. Le Pélodyte ponctué aurait recolonisé la partie nord de son aire de distribution actuelle pendant le Pléistocène (c'est à dire il y a entre 1.8 et 0.1 millions d'années) [Loureiro et al., 2008]. Notons que la description du Pélodyte ibérique est relativement récente [Sanchez-Herraiz et al., 2000] et s'est d'abord faite sur des critères de chants [Paillette et al., 1992; Pargana

et al., 2003].

### 1.3.4 Biologie du Pélodyte

Le Pélodyte ponctué est un animal plutôt discret et assez mal connu. Il a été plusieurs fois étudié au sein des communautés d'amphibiens de Méditerranée mais très peu d'études le concernent exclusivement. Les principaux points étudiés sont la reproduction et le développement larvaire de l'espèce, en lien avec quelques variations environnementales.

#### 1.3.4.1 Longévité du Pélodyte

Le Pélodyte vit relativement longtemps. En captivité, des individus ont dépassé l'âge de 15 ans [Nollert and Nollert, 2003]. Une étude de squelettochronologie réalisée sur une population du nord de l'Espagne [Esteban et al., 2002; Esteban et al., 2004] a permis de découvrir que dans la nature les plus vieux individus capturés lors d'un épisode de reproduction avaient 8 ans pour les mâles et 10 ans pour les femelles. Par ailleurs, l'âge moyen des mâles qui se reproduisent était de 2.8 ans ( $\pm 1.8$ ) et celui des femelles de 5 ans ( $\pm 2$ ). L'âge de la première reproduction serait, selon cette étude, 1 an. Les femelles atteignent leur taille définitive au bout de 5 à 6 ans alors que les mâles ont fini leur croissance à 3 ans.

#### 1.3.4.2 Reproduction

En croisant les informations disponibles à travers les atlas couvrant l'aire de répartition [Castanet and Guyétant, 1989; Geniez and Cheylan, ; Gibbs and Breisch, 2001; Llorente et al., 1995; Loureiro et al., 2008; Aveyron, 2008; Pleguezuelos et al., 2002; Pottier, 2008; Acemav et al., 2003; Bertrand and Crochet, 1992; Destre et al., 2000; Parayre, 1996; Paris, 1985; Pottier, ; Doria and Salvidio, 1994; Escobar et al., 2008; Geniez and Cheylan, 2003; Herpetologica, 1997; Livet, 1978; Nollert and Nollert, 2003; Pages, 1979; Parayre, 1996; Paris, 1985; Pottier, ; Salvador and Paris, 2001; Thirion et al., 2002; Thomas et al., 2003] et quelques articles scientifiques sur le sujet [Toxopeus et al., 1993; Richter-Boix et al., 2006c; Jakob et al., 2003b; Guyétant et al., 1999], il est possible de se faire une idée assez juste de la phénologie de reproduction de cette espèce. Dans la zone nord de son aire de répartition, le Pélodyte ponctué se reproduit exclusivement au printemps (mars-avril), comme la majorité des amphibiens des zones tempérées. Dès que l'on regarde plus au sud, ou plus à l'ouest (sous un climat plus doux), il est possible d'observer des pontes en automne (de septembre à novembre) (Figure 1.15). La présence de têtards issus de ces pontes semble très rare dans les régions océaniques (c'est également le cas dans le nord de l'Italie). Par contre, dès que l'on entre dans la zone méditerranéenne (de façon large), les reproductions d'automne sont fréquentes et produisent des descendants. Ces périodes de reproduction succèdent à de fortes précipitations avec des températures douces. Les informations concernant le nombre de pontes et d'œufs produits par une femelle sont contradictoires selon les auteurs. Il y a cependant un relatif consensus sur le fait que les femelles fragmentent leurs pontes lors d'un épisode de reproduction.

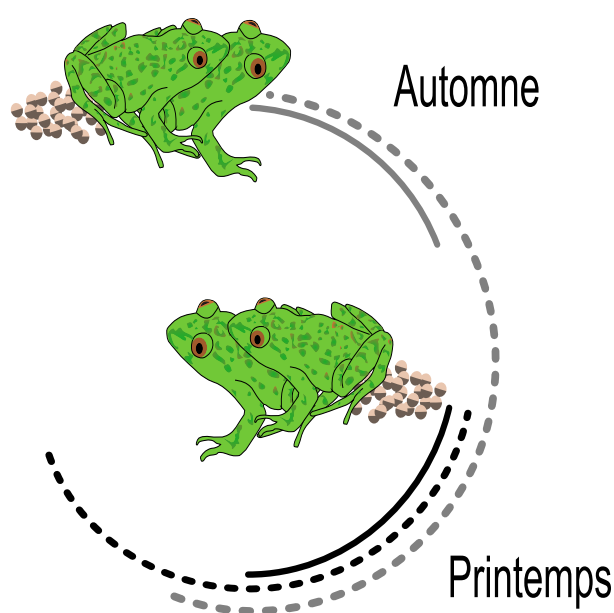


FIGURE 1.15 – Reproduction (traits pleins) et développement larvaire (traits pointillés) du Pélodyte ponctué au cours d'une année (automne en gris et printemps en noir)

#### 1.3.4.3 Développement embryonnaire et larvaire

Commençons par le développement embryonnaire. Il a été décrit par Toxopeus que l'embryon de Pélodyte éclot en une dizaine de jours : de 5 à 15 jours en fonction de la température [Toxopeus et al., 1993]. Il peut arriver que la ponte n'écloie pas du tout et ceci peut être dû notamment à une infection des embryons (par un champignon) [Tejedo, 1991; Pounds et al., 2006].

Après l'éclosion, les larves restent attachées à la gangue de la ponte et se regroupent en essaim à la partie supérieure de la ponte [Guyetant et al., 1999]. Après quelques jours, ils deviennent libres dans le milieu. Le régime alimentaire de ces têtards est constitué principalement d'algues et de détritus [Diaz-paniagua, 1989]. Ainsi les têtards de Pélodyte peuvent survivre dans des milieux (encore) dépourvus de végétation aquatique.

Comme chez tous les amphibiens, la durée de la phase larvaire dépend grandement de la température de l'eau : elle dure de 2 à 8 mois dans la nature (Figure 1.15) [Guyetant et al., 1999]. Elle augmente avec la densité des têtards présents mais diminue en présence de compétiteurs (autres têtards d'anoures) ou lorsque le milieu s'assèche [Joly et al., 2005; Richter-Boix et al., 2006b; Richter-Boix et al., 2004]. La taille à la métamorphose varie entre 14.5 et 18.8 mm (mesure réalisée entre le museau et le cloaque, "Snout-Vent Length", notée SVL) [Joly et al., 2005; Toxopeus et al., 1993]. Elle varie peu en réponse à la température ou à la densité des têtards de Pélodyte mais diminue en présence de compétiteurs [Joly et al., 2005; Richter-Boix et al., 2007b; Richter-Boix et al., 2004]. De même la survie larvaire dépend de la densité de têtards de Pélodyte et de la présence

de compétiteurs mais pas de la température [Joly et al., 2005; Richter-Boix et al., 2007b; Richter-Boix et al., 2004]. Enfin, la prédation (par des larves de libellules) induit des modifications de la morphologie des têtards de Pélodyte [Richter-Boix et al., 2007c]. Il a de plus été montré que les différences morphologiques à la métamorphose (induites notamment par l'assèchement) provoquent des différences de capacité motrices chez les juvéniles [Richter-Boix et al., 2006b].

Il faut noter que tous les compétiteurs n'ont pas le même effet sur le développement larvaire du Pélodyte : ce dernier est particulièrement sensible à *Rana perezi*, *Alytes obstetricans* et *Hyla meridionalis* et beaucoup moins à *Bufo bufo* et *Bufo calamita* [Richter-Boix et al., 2007b].

### 1.3.5 Ce qu'on aimerait savoir sur le Pélodyte

Le titre de cette thèse est très explicite à ce sujet : nous aimerions en savoir plus sur les mœurs du Pélodyte. Il ne s'agit pourtant pas de curiosité mal placée face à un animal trop timide.

Ainsi que nous l'avons vu ci-dessus, le Pélodyte se reproduit à la fois au printemps et en automne dans la zone méditerranéenne. Ceci recouvre deux spécificités : 1) en dehors de la Méditerranée, le Pélodyte se reproduit quasi uniquement au printemps (les reproductions d'automne, si elles surviennent, ne produisent pas de juvéniles) ; 2) en Méditerranée, peu d'espèces se reproduisent en automne et au printemps (on observe des reproductions d'automne chez le Pélobate, *Pelobates cultripes* et plus rarement chez le Crapaud calamite, *Bufo calamita*).

La reproduction de printemps est vraiment la plus fréquente sur l'ensemble de l'aire de distribution, elle répond probablement à des contraintes environnementales pesant sur les adultes et les larves. C'est une saison favorable pour les adultes car les températures y sont clémentes et les précipitations abondantes. Cependant, en région méditerranéenne, l'automne offre également des conditions climatiques appropriées. Entre ces deux périodes, l'été méditerranéen trop sec empêche à la fois une activité de reproduction des adultes et le développement des larves en raison de l'assèchement général des mares temporaires et l'hiver nuit certainement à l'activité des adultes et ralentit le développement des larves.

Il apparaît alors que la reproduction d'automne pourrait constituer une alternative à la reproduction de printemps dans un climat méditerranéen. Cette approche est bien entendu simpliste et ne repose que sur des arguments purement verbaux. Un des premiers buts de cette thèse a été de vérifier l'existence de la reproduction d'automne et surtout de renseigner son importance en répondant aux questions suivantes :

- Quel est le patron de reproduction du Pélodyte au cours d'une année ?
- Y-a-t-il plus de pontes en automne ou au printemps ?

- Peut-on mettre en évidence des contraintes environnementales sur la reproduction des adultes ?
- Est-ce que les deux périodes de reproduction produisent de façon aussi efficace des juvéniles ?
- Quelles sont les contraintes réduisant la survie des larves pour chaque saison ?
- Y-a-t-il des mares d'automne et des mares de printemps ?
- Quelle semble être la meilleure stratégie : automne ou printemps ?

Ces questions sont traitées dans le chapitre 3 décrivant la phénologie de reproduction du Pélodyte.

La dernière question sur la meilleure stratégie de reproduction est au centre de ma problématique mais nécessite beaucoup de précautions. On aimerait savoir comment ce patron de reproduction a émergé et quel est son devenir. Ceci nécessite à la fois d'estimer le succès global lié à un épisode de ponte mais surtout de connaître les stratégies individuelles. En effet, plusieurs scénarios sont envisageables (Figure 1.16). L'existence de deux périodes de reproduction, même au sein d'une même mare, peut résulter de la présence de deux populations temporelles de Pélodytes. On imagine alors des Pélodytes d'automne et des Pélodytes de printemps, partageant la même mare en deux niches temporelles distinctes. Cette structure implique un flux de gènes limité entre les deux sous-populations. C'est-à-dire qu'un individu issu d'une reproduction de printemps doit préférentiellement aller se reproduire au printemps et que les reproducteurs doivent être fidèles à leur saison de reproduction. Il est également possible que ces stratégies de reproduction soient totalement plastiques. Un individu pourrait ainsi, au cours d'une année, se reproduire en automne ou au printemps, selon les contraintes qu'il perçoit. Il pourrait aussi se reproduire à la fois en automne et au printemps pour multiplier ses chances de réussite, utilisant une stratégie *bet-hedging*. Les Pélodytes sont des individus plutôt longévifs et *itéropares* donc leur *fitness* va dépendre de leur succès reproducteur sur plusieurs années ce qui rend l'existence d'une telle stratégie probable.

Pour tester ces hypothèses, il faut définir si les différentes périodes de reproduction et les différences de développement larvaire qui en résultent sont purement plastiques ou dépendent de l'existence de deux sous-populations génétiquement différenciées. C'est l'objet du chapitre 4.

Une fois ces points vérifiés, il faut définir au mieux la *fitness* associée à chaque épisode de reproduction. Ceci nécessite de comparer les développements larvaires des deux cohortes puisqu'il a été montré que la date de métamorphose et la taille à la métamorphose peuvent avoir un impact sur la *fitness* des individus [Altwegg and Reyer, 2003]. Cette comparaison nous amènera étudier les mécanismes qui provoquent des différences de développement larvaire chez le Pélodyte. Ces différents points sont traités dans le chapitre 5.

Jusqu'ici les stratégies individuelles de reproduction du Pélodyte restent inconnues même si des recherches ont débuté dans ce sens et ont échoué ou sont encore en cours comme je l'explique dans le chapitre 2 (sorte de Matériel et Méthodes). Ce chapitre présente, de façon synthétique, l'ensemble des travaux réalisés en expliquant brièvement les

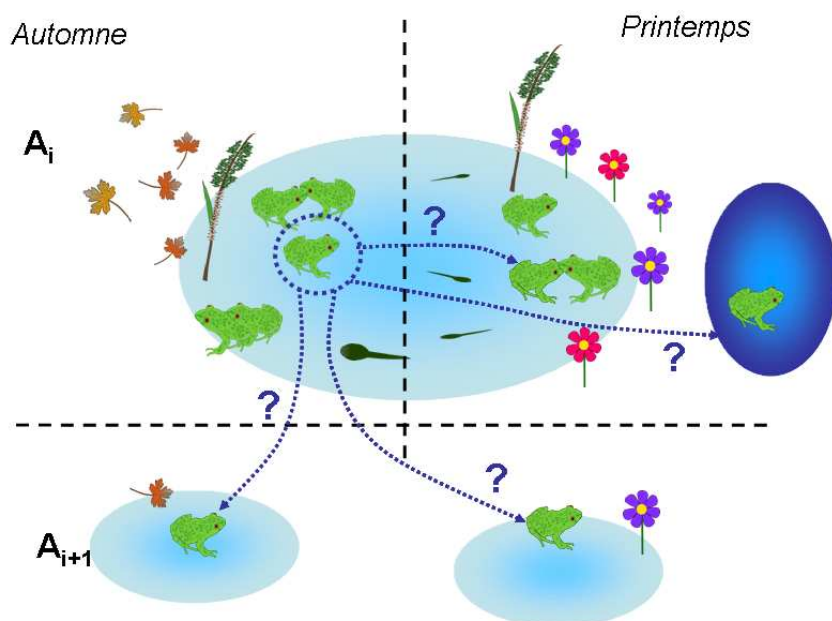


FIGURE 1.16 – Potentielles stratégies individuelles de reproduction. Les feuilles mortes et les fleurs représentent une mare en automne et au printemps, respectivement. La mare à l'eau bleu foncé est un autre site.  $A_i$  indique une année. La position de départ est un Pélodyte qui se reproduit en automne, l'année  $A_i$ , dans la mare principale.

but et les aspects techniques de chaque expérience.

Une dernière problématique a été abordée dans cette thèse, il s'agit de l'impact de la fragmentation sur l'évolution des populations. Le Pélodyte vit en petites populations plus ou moins fragmentées et on s'attend à des effets négatifs de la fragmentation sur le devenir des populations. Une façon de tester ces prédictions est d'étudier les relations entre **génotypes** et **phénotypes**. Ceci est relaté dans le chapitre 6.

## Chapitre 2

---

# Comment étudier le Pélodyte ponctué ?

### 2.1 Avec des bottes et une épuisette...sur le terrain

Le premier objectif du suivi de terrain était de caractériser finement le patron de reproduction du Pélodyte dans la région de Montpellier [Heyer, 1994; Dodd, 2010]. Les informations disponibles jusque là (regroupées depuis peu dans un atlas de la région Languedoc-Roussillon) constituent un ensemble fragmentaire basé sur les relevés effectués par un grand nombre de personnes sur un grand nombre de sites.

Notre approche était beaucoup plus ciblée, basée sur une vingtaine de mares, réparties dans 4 zones, relativement proches de Montpellier (Figure 2.1). Nous avons choisi des sites contrastés pour pouvoir vérifier l'influence des caractéristiques de la mare (permanence, substrat, contexte). Une des idées à tester était que les sites temporaires (qui connaissent des périodes d'assèchement au cours de l'année) seraient plus favorables à une reproduction automnale comparativement aux sites permanents. De plus, il peut y avoir une utilisation différentielle des sites suivant les espèces. Les zones de Gardiole et Cournonterral comprennent un plus grand nombre de sites temporaires (et artificiels) que les deux autres zones. Ceci est dû à la construction de points d'eau par les chasseurs pour attirer le gibier. Ces petites mares (6 mètres de diamètre au maximum) sont utilisées principalement par le Pélodyte et parfois par le Crapaud calamite.

Un suivi relativement rapproché dans le temps a été réalisé : les sites étaient visités toutes les 2 semaines pendant ces trois années de thèse. La fréquence des visites a été choisie en fonction de l'effort à fournir pour effectuer un tel suivi (qui a représenté une journée de terrain par semaine sur 3 ans) mais aussi de la probabilité de manquer des épisodes de reproduction. Le développement embryonnaire du Pélodyte varie entre 5 et 15 jours pour des températures comprises entre 10 et 15°C. Dans de nombreux cas, les pontes étaient vues lors de deux visites successives. Par contre, dans les périodes de forte température (septembre, avril), il est plus probable de louper une ponte.

Les indications pour chaque visite étaient les suivantes (cette liste était fournie à tous les observateurs) :

- Noter l'état de mise en eau des mares (la hauteur d'eau et la dimension de la mare, en faisant des pas)
- Compter les pontes de Pélodyte et indiquer leur état (fraîche, pas fraîche, embryons développés, embryons sortis de leur gangue). Noter la taille des pontes par catégorie : petite (50 à 100 œufs), moyenne (entre 100 et 200 œufs) et grande (de 200 à 300 œufs)
- Mesurer la densité et le stade des têtards de Pélodyte : à l'épuisette. Se munir de l'épuisette standard, donner 5 à 10 coups d'épuisette (en fonction de la taille de la mare) également répartis dans la mare. A chaque remontée d'épuisette, compter le nombre de têtards de Pélodyte prélevés et relever leur taille (se servir du guide visuel pour trouver la bonne classe de taille) et leur stade : petits têtards, têtards moyen, gros têtards, stade bourgeon de pattes arrière (BParr), petites pattes arrière (PPA), pattes arrière développés (PA), bourgeon de pattes avant (B4P), 4 pattes (4P), juvénile (J, lorsque la queue a régressé). Noter au fur et à mesure (à moins d'avoir une bonne mémoire).
- Noter la présence d'adultes de Pélodyte (tenter de savoir le sexe, indiquer si chant, accouplement).
- Noter la présence des diverses espèces d'amphibiens (quantité) : œufs, larves (stade), juvénile, adulte (chant, accouplement)
- Noter la présence d'insectes prédateurs (larves de libellules, notonectes, larves de stratomyia, dytique, triops...) et leur quantité (en nombre d'individus de chaque espèce par coup d'épuisette)
- Mesurer la température (en surface) et le pH de chaque mare
- Ne pas hésiter à faire une catégorie "observations" pour indiquer tout ce qui peut être utile à la compréhension ultérieure du système.

Note : la mesure du pH a finalement été abandonnée, après que le pHmètre ait rendu l'âme.

Le suivi de terrain a impliqué plusieurs personnes : Vincent Mouret, Alain Fizesan, Denis Rey, Simon Russeil, Jérémy Aubain (dans l'ordre de leur succession sur des contrats de 6 mois), Pierre-André Crochet et moi-même. Lorsque c'était possible, j'alternais les visites avec les autres observateurs pour pouvoir corriger à la fin les biais liés aux observateurs.



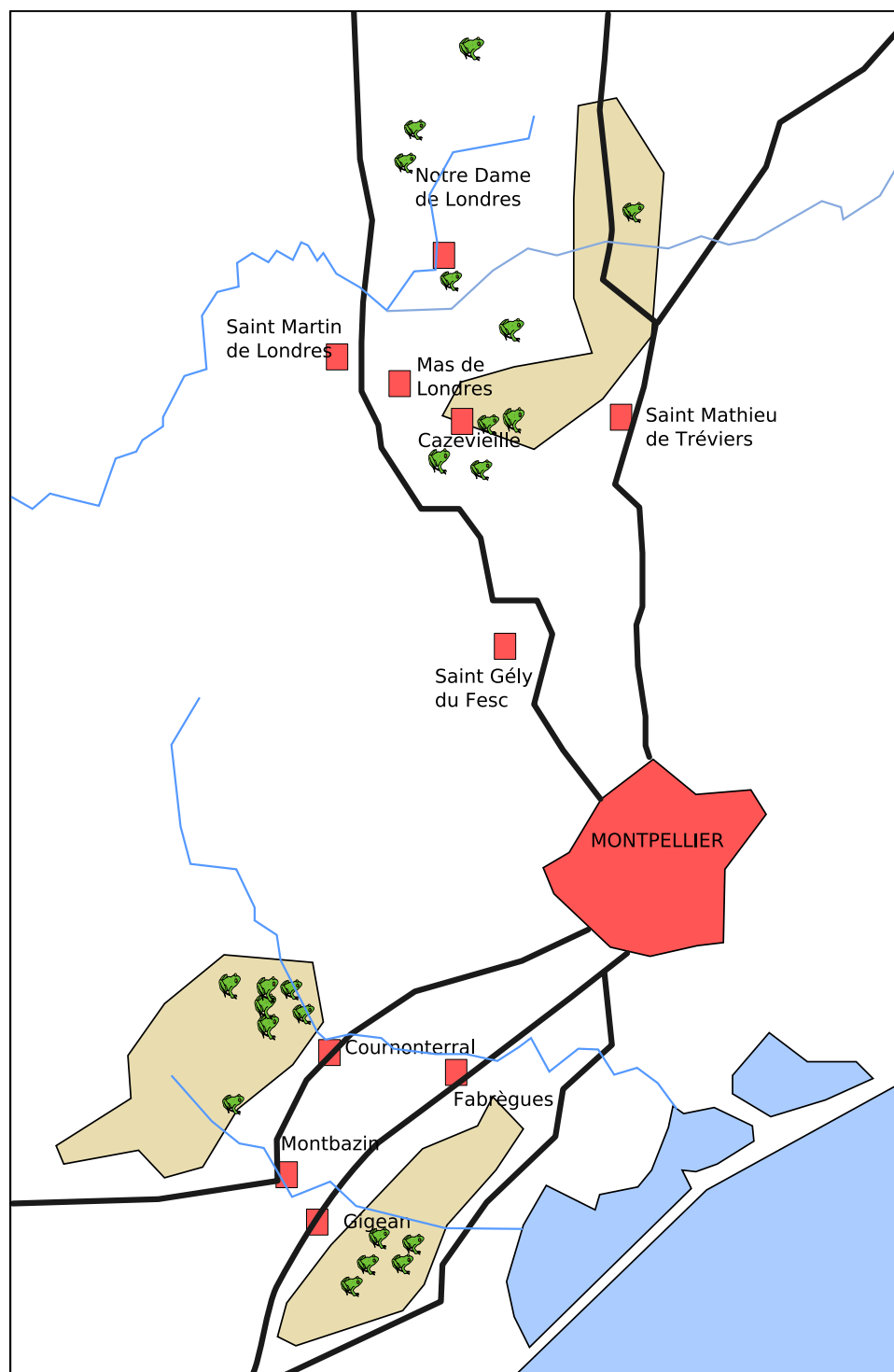


FIGURE 2.1 – Carte représentant la zone d'étude. Chaque site étudié est représenté par une petite crapouille verte. Les lignes noires épaisses représentent les principaux axes routiers, les fines lignes bleues, les cours d'eau et les polygones, les reliefs. Certains sites ont été utilisés pour l'étude génétique mais ne figurent pas dans le suivi phénologique

L'ensemble des données collectées pendant ces trois ans a été stocké dans une base de données Access. Ces données ont servi à écrire un article sur la phénologie du Pélodyte (chapitre 3) et un autre article sur la *fitness* larvaire associée à chaque saison (chapitre 5). Les données récoltées pendant la troisième année de terrain n'ont pas été analysées pour des raisons de calendrier par rapport à la fin de ce travail. Elles seront ajoutées à la version finale de l'article de phénologie.

## 2.2 Avec des eppendorfs et du Chelex...génotyper

### 2.2.1 Utilité

La génétique des populations est un outil efficace pour répondre à des questions variées. La première question qui nous intéressait était de savoir s'il existait deux populations temporelles de Pélodytes au niveau régional ou même local, en recherchant les structurations génétiques existantes.

La deuxième question était de savoir quelles étaient les stratégies individuelles de reproduction : des stratégies fixées pour chaque individu (jusqu'à l'existence de deux sous-populations temporelles, testée par l'existence ou non de structurations génétiques entre les cohortes) ou des stratégies mixtes (reproduction à la fois en automne et au printemps ou choix aléatoire entre les deux périodes de ponte chaque année). L'approche la plus directe aurait été un marquage des reproducteurs suivi de fréquentes recaptures à chaque épisode de ponte (cette idée est abordée dans le paragraphe 4). Ceci n'ayant pas été possible, nous avons choisi de faire une sorte de marquage génétique des reproducteurs en récoltant un fragment de toutes les pontes produites pendant deux années sur un ensemble de quatre sites proches (Bouillès, Combe l'Escure, Bergerie et Pataris). L'idée était ensuite de génotyper les pontes pour déterminer quels sont les *génotypes* des parents et vérifier si on retrouve ces mêmes *génotypes* pour d'autres périodes de reproduction. Cette approche implique un génotypage très important : plus de 270 pontes ont été échantillonnées...ce qui représente plus de 2000 individus à génotyper à raison de 8 individus par ponte. De plus, les sites avaient été choisis pour leur petite taille mais sur le site de Pataris, une trentaine d'adultes ont été observés lors d'un épisode de reproduction rendant la combinatoire de tous les *génotypes* parentaux possibles très élevée. Cette analyse a donc été entreprise mais est actuellement interrompue en attendant notamment d'utiliser de nouveaux marqueurs microsatellite [van de Vliet et al., 2009].

Une troisième question a été traitée grâce aux marqueurs moléculaires : il s'agit des relations *génotypes/phénotypes* en populations fragmentées, traitées dans le chapitre 6. Nous avons utilisé les marqueurs moléculaires pour connaître les niveaux d'hétérozygotie et les variations alléliques des cohortes de têtards en lien avec leurs performances (de croissance et de survie).

La dernière question était la structuration génétique spatiale des populations de Pélodytes à l'échelle régionale. Nous avons, à cet effet, échantillonné une quinzaine de sites et réalisé des analyses de différenciation (via les mesures de  $F_{st}$ ) et d'assignation des individus pour définir des entités génétiquement distinctes. Ces analyses n'ont, à ce jour, été incluses dans aucune potentielle publication (faute de temps) et n'apparaissent donc pas dans cette thèse.

## 2.2.2 La pratique du génotypage

Les marqueurs moléculaires neutres (c'est à dire normalement non soumis à la sélection naturelle) fréquemment utilisés sont les marqueurs microsatellite. Un microsatellite est un motif répété de di, tri ou tétra nucléotides au sein d'une séquence d'ADN. Ces motifs sont principalement présents dans des séquences d'ADN non codant (même si certains gènes possèdent des motifs microsatellite).

Mon travail de thèse a débuté avec la réalisation d'une banque microsatellite pour définir des marqueurs microsatellite utilisables chez le Pélodyte. Ceci a abouti à la rédaction d'une "primer note" (Annexe B).

Une fois ces marqueurs disponibles, les populations de Pélodyte ont été échantillonnées. Il s'est agi uniquement des cohortes de têtards et des échantillons d'œufs. La première étape consiste à extraire l'ADN ce qui a été réalisé en utilisant du Chelex pour réduire au maximum le coût de l'extraction (protocole fourni dans la primer note). Le génotypage a été réalisé sur 8 loci pour tous les individus : PPU2, PPU5, PPU6, PPU10, PP11, PPU15, PPU16 et PPU17. Les loci sont regroupés en deux multiplexes qui permettent d'amplifier (par PCR) et de passer les produits de PCR au séquenceur par groupe de quatre pour gagner du temps et de l'argent. Ceci est permis par l'existence de fluorochromes de différentes couleurs attachés aux amorces utilisées pour l'amplification.

L'ensemble des analyses réalisables à partir des génotypes est très grand : analyses descriptives de base (fréquences alléliques, équilibre de Hardy-Weinberg, hétérozygotie attendue et observée, F-statistiques), analyses d'apparentement (Kinship), de clustering (STRUCTURE ou GENELAND), de reconstitution de génotypes parentaux sont les principales utilisées pour ce travail. Elles sont détaillées à travers les différents manuscrits.

## 2.3 Avec des pots de fleurs et des granulés pour lapin...l'élevage en laboratoire

### 2.3.1 Buts

Un des premiers buts de l'élevage de larves de Pélodyte était de savoir si les différences de développement observées sur le terrain entre des têtards d'automne et des têtards de

printemps sont d'origine plastique ou génétique. Il s'agit alors d'élever les deux cohortes dans des conditions similaires et de voir si les différences persistent (ce qu'on attend si l'origine est génétique) ou disparaissent (lorsque tout est plastique).

Nous avons également profité de cet élevage pour réaliser des expériences de génétique quantitative qui permettent d'évaluer l'héritabilité des traits étudiés ou leurs corrélations génétiques. Une expérience de transfert séquentiel de têtards avait pour but de comprendre les mécanismes qui expliquent les différences de développement existant entre les deux cohortes.

### 2.3.2 Protocole d'élevage

Comme indiqué dans le titre, élever des têtards de Pélodyte requiert simplement un grand nombre de pots de fleurs en plastique (plus de 600) et des granulés pour lapin (gracieusement fournis par le CRBM). Les fonds des pots de fleurs ont été découpés et remplacés par des filets à maille fine (1 mm). Les pots étaient placés dans quatre grands bacs, ainsi l'eau circulait (plus ou moins) entre chaque pot au sein d'un bac. Il y avait également une recirculation d'eau entre les différents bacs pour limiter les effets bacs. Un têtard était placé dans chaque pot et nourri *ad libitum* avec des granulés pour lapin (luzerne).

Il y a eu trois expériences d'élevage en conditions contrôlées plus une (longue) expérience de transfert séquentiel (consistant à prendre des individus issus d'un même épisode de ponte sur un site naturel et à les élever en laboratoire après un temps croissant passé sur le terrain). La survie, la croissance et le temps de métamorphose étaient les traits mesurés pour chaque expérience.

L'ensemble des considérations sur les calculs d'héritabilité ou les analyses statistiques nécessaires pour comprendre mes résultats se trouvent dans les manuscrits concernés (chapitre 4, 5, et 6).

## 2.4 Tentatives et échecs

J'avais envie de faire un petit paragraphe qui raconte ce que j'ai tenté, ce qui a raté et ce qui aurait pu marcher. La principale chose qui a raté est le marquage individuel de Pélodyte [Anholt et al., 1998]. Ceci nous aurait permis de connaître les stratégies individuelles de reproduction (ainsi que je l'ai indiqué plus haut). Une autre idée était d'évaluer par cette méthode la survie juvénile. C'était un pari fort risqué mais pas fou de penser qu'on retrouverait une quantité suffisante d'individus marqués. Il fallait donc des marques pas trop chères et suffisamment petites pour pouvoir être utilisées en grande quantité (et perdues dans une grande proportion) sur des juvéniles de Pélodyte (entre 1,5 et 2 cm). Les tags alpha-numériques remplissaient les deux contraintes. Ce sont des petites marques souples, en polymère, avec une combinaison d'une lettre et deux chiffres



FIGURE 2.2 – Insertion d'un tag sur un Pélodyte juvénile

écrits en couleur fluorescente sur fond noir. Elles sont totalement plates et mesurent 2,7 mm sur 1,2 mm.

Ces tags ont été testés sur des juvéniles de Pélodyte. Ils étaient insérés sous la peau, sur la face intérieure de la cuisse (Figure 2.2). Il était même possible de les utiliser sur des individus pas totalement métamorphosés (à partir du moment où les pattes arrière étaient bien développées). Les individus taggés ont été relâchés sur le terrain d'expérience du CEFÉ dans une mare creusée pour l'occasion. Au bout de quelques semaines, les individus étaient encore en vie et la plupart des tags encore en place. Cependant, la suite n'a jamais été effectuée. En effet, certains adultes ont également été taggés sur le terrain (par Pierre-André Crochet) et il est apparu que les marques n'étaient finalement pas visibles à cause de la pigmentation de la peau des adultes (la peau est claire mais trop épaisse). De plus, les marques semblaient se déplacer facilement sous la peau des adultes (il n'y a pas d'adhérences cutanées chez les anoures).

En plus de pouvoir marquer des adultes, il aurait fallu pouvoir attraper des reproducteurs. Nous avons donc entouré deux mares (privées) en tendant des bâches entre des piquets et placé des pièges à l'intérieur du site entouré, en septembre 2007. Les individus pouvaient entrer pour venir se reproduire dans la mare et n'étaient pas capables de sortir. Il fallait ensuite passer régulièrement vérifier les pièges pour récupérer et marquer les adultes. J'ai ainsi visité les deux mares tous les deux jours jusqu'au mois de janvier 2008.

Aucun adulte n'a été attrapé et des pontes ont été observées après un épisode pluvieux où les pièges avaient été refermés (en mon absence, pour éviter que des individus ne restent trop longtemps piégés et ne meurent). En janvier, un des deux sites a été totalement démantelé sans que l'on sache jamais par qui et pourquoi. A la suite de cet événement et voyant l'absence d'efficacité jusque là, j'ai décidé d'arrêter cette expérience. Le deuxième site a ensuite été remis dans son état naturel.

Je profite de ce chapitre pour préciser que l'ensemble des travaux effectués sur le Pélodyte ponctué (comme sur toutes les espèces d'amphibiens) nécessite d'obtenir des autorisations. La manipulation d'individus, le prélèvement d'échantillons génétiques ou de pontes, l'euthanasie d'individus requièrent d'avoir les autorisations appropriées délivrés par la Direction Régionale de l'Environnement. C'est une contrainte supplémentaire lors de l'étude d'espèces protégées et cela pousse à l'anticipation (impossible de lancer une expérience sur un coup de tête). L'ensemble des expériences menées dans cette thèse ont donc fait l'objet d'autorisation de capture ou d'enlèvement de spécimens de Pélodyte ponctué.

## Chapitre 3

---

# Se reproduire au printemps ou en automne : causes et conséquences ?

La sélection naturelle change continuellement dans le temps et dans l'espace. Au niveau spatial, toutes les échelles peuvent être concernées, de l'habitat à l'aire de distribution toute entière pour une même espèce. Au niveau temporel, les variations peuvent être régulières, prévisibles, calquées sur un pas de temps journalier, annuel ou alors stochastique à des échelles parfois bien plus grandes.

La phénologie est l'apparition d'événements périodiques dans le monde du vivant, déterminés précisément par les variations saisonnières du climat. En région tempérée, la saisonnalité est marquée, elle définit quatre périodes bien contrastées. Ainsi de très nombreuses espèces, ont un cycle de vie basé sur cette alternance des saisons. Plus précisément, chez les plantes, la phénologie s'applique à la floraison ou à la fructification et chez les animaux, on parlera de phénologie de migration, de reproduction, de métamorphose des insectes. Ainsi pour chaque phénomène considéré la date choisie permet de maximiser la réussite de l'événement et correspond, lorsqu'il s'agit de la reproduction, à un compromis entre des contraintes existant sur l'adulte et sur les descendants.

C'est typiquement le cas chez les amphibiens : l'état énergétique des adultes est une des contraintes du système, la deuxième étant la possibilité pour les larves de se développer correctement et de se métamorphoser avant l'assèchement de la mare choisie par les adultes. En milieu tempéré, la plupart des espèces d'amphibiens optent pour une reproduction printanière. Dans les régions méditerranéennes, certaines espèces se reproduisent également en automne comme c'est le cas pour le Pélodyte ponctué. Cela signifie que les contraintes rencontrées en automne peuvent être dépassées sous certaines conditions.

Le suivi sur le terrain de la phénologie de reproduction du Pélodyte tente de répondre à ces questions : Quelles sont les conditions qui favorisent la reproduction d'automne pour le Pélodyte ? Quelles contraintes demeurent ? Peut-on comparer ces contraintes à celles rencontrées au printemps ? Quelle est la saison la plus adéquate pour se reproduire et produire des descendants ayant des chances de survivre jusqu'à la métamorphose ?

Nous avons analysé les caractéristiques des mares pendant l'automne et le printemps. Au moment de la reproduction, les mares sont plus grandes et plus profondes au printemps mais la température est plus élevée en automne. Pendant le développement larvaire des Pélodytes, la quantité de larves d'autres espèces d'amphibiens est plus importante au printemps et en particulier, les espèces présentes sont des compétiteurs du Pélodyte. La pression de prédation semble similaire aux deux saisons.

Nous montrons que la reproduction est bien bimodale avec un pic en octobre et un autre en février. Il n'y a pas de reproduction en décembre ni de mai à août. L'effort de reproduction est deux fois plus important en automne qu'au printemps. Jusque là, on pensait que la reproduction d'automne était moins importante que la reproduction printanière (d'après les données des atlas, la publication de Guyétant et les données de Richter-Boix en Espagne). Nous n'avons pas trouvé de facteur explicatif convaincant pour comprendre ce qui limite la reproduction d'automne ou de printemps. La survie des larves est basse (comme attendu chez ces espèces, de l'ordre de 2%) et est similaire entre les deux saisons. Au printemps, la survie larvaire diminue drastiquement en présence de têtards issus de la cohorte d'automne (ceci s'observe sur le taux d'éclosion mais les différences ne sont pas significatives). Ces résultats vont dans le sens de nos observations de terrain : les têtards d'automne (ayant atteint une certaine taille) ont tendance à manger les œufs nouvellement pondus (l'oophagie par les têtards de Pélodyte avait déjà été montrée mais uniquement sur des œufs de Crapaud calamite). Ce phénomène de cannibalisme mène à une sorte d'exclusion entre les deux cohortes : dans un site, si la reproduction d'automne réussit, la reproduction de printemps a toutes les chances d'échouer et réciproquement.

Ainsi la reproduction d'automne est favorisée par des conditions climatiques compatibles avec la reproduction pour le Pélodyte (températures clémentes et pluviométrie suffisante) et surtout par la quasi-absence de compétition interspécifique à cette période de l'année. De plus, le Pélodyte investit fortement dans cette reproduction automnale et la survie des larves est identique à celle observée pour des cohortes de printemps. Ainsi, la reproduction d'automne produit au final plus de descendants que la reproduction de printemps. Ces résultats soulèvent de nouvelles questions sur la nature des deux épisodes de reproduction : correspondent-ils à l'existence de deux sous-populations de reproducteurs ou est-ce juste un comportement plastique de la part des adultes ? Cette question est résolue dans le chapitre 4. L'autre question est de savoir si la *fitness* des juvéniles issus de la reproduction d'automne et de printemps est la même ou si les nombreux individus produits en automne connaissent des baisses de survie ou de fécondité par la suite (rétablissant ainsi un certain équilibre dans l'efficacité des deux saisons de reproduction). L'étude des traits larvaires de chaque cohorte, présentée au chapitre 5, permet de répondre en partie à cette question.



**Temporal niche partitioning and priority effect  
in Mediterranean Parsley frog *Pelodytes punctatus*.**

HELENE JOURDAN-PINEAU, PIERRE-ANDRE CROCHET, PATRICE DAVID

Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5175 CNRS, 1919 route de Mende, 34293  
Montpellier cedex 5, France

*Received:*

*Keywords:* breeding phenology, priority effects, larval survival, niche partitioning, *Pelodytes punctatus*

*Correspondence:* Hélène Jourdan-Pineau, CEFE, UMR 5175 CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France; Fax: (+33) 4 67 41 21 38; Email: [helene.jourdan@cefe.cnrs.fr](mailto:helene.jourdan@cefe.cnrs.fr)

## ABSTRACT

Temporal partitioning of breeding activity is a common strategy to reduce both inter and intraspecific competition. However, if successive cohorts overlap, fitness gains may be asymmetric, because priority effects may advantage early breeding over late breeding. In temperate environments, most long-lived vertebrates produce juveniles once a year in spring, but some can breed twice (autumn and spring). The costs and benefits of temporal partitioning depend on relative quality of environmental conditions (predation intensity, temperature etc), as well as priority effects (associated with being first or second on the site) and habitat choice (e.g. avoidance of sites with competitors). We studied the breeding phenology and reproductive success associated with the use of two temporal niches (autumn and spring) in a Mediterranean frog, *P. punctatus*, living in temporary ponds.

We showed that breeding phenology is typically bimodal with a higher breeding effort in autumn. Survival from egg to metamorphosis was not different between seasons and there was no significant effect of predation or interspecific competition on survival. However, larval survival of spring cohort was lower in the presence of tadpoles from the autumn cohort. We propose that this is linked, at least partly, to the cannibalistic oophagy of old tadpoles observed in the field. At site level, this priority effect implies that spring breeding is successful only if autumn breeding has previously failed. Last, we found no sign of conspecific avoidance for oviposition since the presence of old parsley frog tadpoles has no effect on breeding probability or breeding effort.

We conclude that the fitness associated with autumn breeding is higher and the use of the two breeding seasons may constitute a bet-hedging strategy or a pure opportunistic response.

## INTRODUCTION

Temporal partitioning of niche within a species is one of many possibilities to reduce inter and intraspecific competition for mates or resources (Anders, Martin et al. 2001). This phenomenon has been documented for breeding activity (for example, between syntopic species of the same genus (Bruseo and Barry 1995) or within species (Eitam, Leon et al. 2005)). Temporal variation in reproductive activity is supposed to influence community structure by modulating interspecific competition (Carothers and Jaksic 1984; Richter-Boix, Llorente et al. 2006; Richter-Boix, Llorente et al. 2007). Similarly, community composition may depend on species arrival (Lawler and Morin 1993; Blaustein and Margalit 1996). Moreover, within species, progeny produced by late breeding may suffer from competition and even predation from earlier cohorts (Ryan and Plague 2004; Eitam, Leon et al. 2005). Such intraspecific priority effects are often difficult to disentangle from seasonal effects simply linked with environmental differences experienced by the temporal cohorts (Lawler and Morin 1993). Moreover, if priority effects are strong, they may influence the selection of breeding sites by late breeders to limit the competition by conspecifics (Halloy and Fiano 2000; Halloy 2006; Sadeh, Mangel et al. 2009) which may restrict late breeders to poorer sites (Crump 1991).

Up to now, temporal niche partitioning and priority effects have been studied mostly in a community context. At the intraspecific level, priority effects are expected to change the evolution of temporal niche partitioning by modifying the cost and benefits of such strategy. We therefore looked whether priority effects influence the relative success of temporal niches. In Mediterranean regions, amphibians breeding in temporary ponds show large breeding asynchrony both between and within species (Diaz-Paniagua 1988; Jakob, Poizat et al. 2003; Richter-Boix, Llorente et al. 2006; Vignoli, Bologna et al. 2007). More precisely, whereas most species typically breed in spring, some species breed earlier at the end of winter, and

some even breed in autumn (in addition to spring). This is the case on the parsley frog, *Pelodytes punctatus*, in which this breeding pattern is restricted to the Mediterranean region, while only spring breeding is observed in the rest of the range and in altitude in Spain (Paris 1985; Guyétant, Temmermans et al. 1999; Jakob, Poizat et al. 2003; Richter-Boix, Llorente et al. 2006). We here quantify the use of these two temporal niches (ie breeding phenology), and the costs and benefits associated with autumn and spring breeding, using a 2-year field survey. We studied the priority effects between cohorts to determine whether there is an asymmetric advantage of early tadpole cohorts over late cohorts. Finally, we investigated whether breeders avoid sites with conspecifics. To our knowledge, this is the first study of intraspecific priority effects in field situation.

## MATERIAL AND METHODS

### **Field survey**

The field study was carried out from September 2007 to August 2009 (hence encompassing two autumn and two spring breeding events) in 19 ponds situated in 4 geographical areas near Montpellier (Annex A, for details see Jourdan-Pineau, Crochet et al. 2010). The ponds surveyed spanned the range of aquatic breeding habitats used by Parsley frog in this region. It included temporary and permanent as well as natural and artificial sites.

Each pond was surveyed twice each month. The parsley frog's embryonic period ranges from 5 days at 15°C to 15 days at 10°C (Toxopeus, Ohm et al. 1993). Moreover, embryos stay attached to the egg jelly for several days after hatching (Guyétant, Temmermans et al. 1999). Thus, with an interval of 15 days between successive visits, we may have missed a few clutches but we have avoided double-counting clutches since 15-day old clutches can readily be distinguished from new ones based on the developmental stages of the embryos. During each visit, we looked for newly deposited egg masses throughout the entire water body (mean

egg mass size: 10 cm long). The probability of detection of an egg mass, even if not perfect, proved to be similar in autumn and in spring. The observation of young larvae that cannot be attributed to recorded breeding event (no clutches detected in the preceding visit) gives a rough indication of the probability to miss a laying event. In our dataset, this is the case for only 2% of the larval cohorts.

Reproductive strategy of Parsley frog was studied using two measures: the probability of spawning and the breeding effort. Spawning probability is a simple binomial variable indicating whether any new egg mass was observed during a visit. Breeding effort measures the quantity of egg produced each time we detected egg laying (there is no null breeding effort from this point of view). It is obtained by counting the number of egg masses and weighting each egg mass by its size as explained below.

We assessed the success of a reproductive event by estimating the hatching rate, the larval survival (from hatching to metamorphosis) and the survival from egg to metamorphosis. Hatching rate was simply estimated as the ratio of small tadpoles to the number of eggs spawned. Based on egg mass counts, we estimated the number of eggs laid in each pond. Egg mass were classified as small, medium and large and this corresponded to an average of 75, 150 and 250 eggs per mass, respectively (Salvador and Paris 2001 and personal observation). To assess the survival of tadpoles in the ponds over time, we used a standardized dipnetting protocol. In each pond, we made five to 10 dip-net hauls (depending on the pond size). Tadpoles that were collected in the dip nets were counted before being released on site. The number of tadpoles in a pond was estimated using the mean number of tadpoles caught per dip-net haul. This measure of “tadpole density” (per dip-net) was then scaled to a sampling surface of 1 m<sup>2</sup> (we estimated that one dip-net haul sampled a surface of 0.5 m<sup>2</sup>, taking the dip-net size and the length of the haul into account). Finally, the number of tadpoles per

square meter was multiplied by the surface of the pond to produce a rough estimate of total tadpole number.

Survival to metamorphosis was estimated as the ratio between the number of juveniles emerging from the pond and the total number of eggs produced for a given breeding event. However, juveniles cannot be counted directly because they leave the sites as soon as metamorphosis is complete. The number of juveniles was extrapolated from the mean number of tadpoles counted in the last three visits before we observed any metamorph in the pond (we made the realistic assumption that survival is very high at this time). It was sometimes impossible to follow the larval development and metamorphosis of offspring from a particular breeding event. Parsley frogs may lay eggs three to four times during each seasonal breeding event. In such cases, the successive sub-cohorts produced are undistinguishable after a few weeks, and we summed the eggs counted in two or three successive visits to evaluate survival from a combination of breeding events within a given breeding seasonal cohort.

Last, as the survival to metamorphosis includes the hatching success, we also used the larval survival that is the probability to survive from first larval stage (after hatching) to metamorphosis. This is merely the ratio of survival to metamorphosis on hatching rate.

Survival measures should be viewed as an index that we will use to assess the differences of reproductive success between seasons, as there is no reason to suspect any seasonal bias in this index.

### **Explanatory variables**

Explanatory variables described the constraints perceived by breeders and acting on eggs and larvae during their development. These are mainly variables describing the hydroperiod, the presence of intra- or inter-specific competitors and predators. Thus, for each visit, we evaluated the size of the pond to see if it has an impact on reproductive effort and survival of

offspring. In addition, for each spawning event, we determined if the pond dried before the metamorphs emerged from the pond. This was coded as a binomial variable. Climatic factors (temperature and rainfall) were not taken into account in our study. Water temperature is known to influence widely parsley frog tadpole development (Joly, Morand et al. 2005; Jourdan-Pineau, David et al. 2010) and it wasn't our aim in this study to deal with larval development. Besides, the impact of rainfall and air temperature on breeding activity has also been previously established for parsley frog (Toxopeus, Ohm et al. 1993; Guyétant, Temmermans et al. 1999; Jakob, Poizat et al. 2003; ACEMAV-coll., Duguet et al. 2003; Richter-Boix, Llorente et al. 2006). In brief, in temporary ponds, oviposition takes place after heavy rains whereas in more permanent ponds, an increase in diurnal temperature seems sufficient to induce breeding activity.

Total counts for each amphibian species and invertebrate predators captured in each pond were divided by the number of dipnet sweeps taken in each pond. This procedure yielded abundance on the basis of catch per unit effort and could therefore be compared across localities. Adult amphibians were also visually counted. The amphibian community of the area consists of 7 anuran species (*Pelodytes punctatus*, *Pelobates cultripes*, *Alytes obstetricans*, *Bufo bufo*, *Bufo calamita*, *Hyla meridionalis*, and *Pelophylax* sp., *P. ridibundus* or *P. perezi* & *kl. grafi*, depending on the sites) and two urodeles (*Lissotriton helveticus* and *Triturus marmoratus*). Experimental studies previously reported differential larval competitive effect of some of those species on *P. punctatus* (Richter-Boix, Llorente et al. 2007); however, as the composition of species assemblages varies continuously, and since there was very few information for some species (especially *Pelobates c.* and *Alytes o.*) we opted for a sum of unweighted competitor species densities assuming that all species have the same effect on parsley frog. Urodele adults were considered separately from other amphibian

species since they may be predacious over eggs and small tadpoles. Actually, due to the few occurrences of *Triturus marmoratus*, only *Lissotriton helveticus* was considered.

Three types of insects were considered potential predators: dragonfly larvae (Anisoptera), backswimmers (Heteroptera, Notonectidae) and diving beetles (Coleoptera, Dytiscidae) (Travis, Keen et al. 1985; Cronin and Travis 1986; Richter-Boix, Llorente et al. 2007). Since there were very few diving beetles, analyses of predation are based on dragonfly larvae and notonectids. The density of predacious insects was assessed only during the second year of the field survey.

Data from literature indicates that only small tadpoles (<12 mm snout-vent length) have lower survival due to predation by aquatic invertebrates (Tejedo 1993). Above this size, the predators will only injure them or even fail to catch them. Larvae laid in autumn reached this limit size in about 3 months, whereas only 1.5 month is necessary for larvae laid in spring (Jourdan-Pineau, David et al. 2010). Thus, we used the mean density of predators and competitors over a period of 3 months after spawning date (actually observation of egg mass) for autumn tadpoles and 1.5 months for spring tadpoles. When a cohort disappeared before the end of those temporal periods, the mean density of predators and competitors was calculated over the whole period of tadpole presence in the pond. Since it is not well known if the effect of competition on survival occurs mostly in the beginning of larval development or not, we also used the mean density of competitors during the whole larval period.

### **Statistical analyses**

We define split the whole year into 3 periods: the two studied temporal breeding niches and one period with no breeding activity. The first period referred hereafter as to “autumn” lasts from September to December, the second referred as to “spring” lasts from January to April and the third one referred as to “summer” period lasts from May to August.



To compare the two temporal niches, we ran both one-way ANOVAs (for physical parameters of the ponds) and non-parametric signed rank Wilcoxon tests (for predation and competition pressure) comparing autumn and spring season over the two-year survey. The analysis of breeding probability (0 or 1) was analysed assuming a binomial distribution and using a mixed-effect models with the site effect as random effect. After a  $\log(x)$  transformation, the breeding effort (number of eggs produced when there was at least one egg mass) was analysed assuming a normal distribution with standard multiple regressions (site effect was not significant).

The analyses of survival (i.e hatching rate and larval survival from small larvae to juveniles) required the use a  $\text{Arcsin}(\sqrt{x})$  transformation to help normalize the distribution and reduce the heteroscedasticity, before running multiple regressions (site effect was not significant).

We tested the random distribution of successful breeding across the two seasons for one site, using a Poisson log-linear model (Manly 1985; David and Jarne 1997; R-Development-Core-Team 2008).

## RESULTS

### **Breeding phenology**

The probability of finding at least one egg mass when visiting a pond (filled with water) was not different in autumn and in spring (breeding probability:  $0.18 \pm 0.4$ , mean  $\pm$  S.D per visit in autumn (147 and 173 visits during the first and the second year from September to December) and  $0.22 \pm 0.4$  per visit in spring (171 and 159 visits the first and the second year from January to April)). On the 19 sites surveyed, breeding occurred in 14 and 17 sites in autumn and in 17 and 16 sites in spring (for the first and second year, respectively) resulting in a mean number of breeding events of  $1.76 \pm 1.22$  and  $1.95 \pm 1.50$  per site in autumn an spring, respectively ( $\chi^2_1=0.348$ ,  $p=0.55$ ). No clutch was observed in ponds from May to August.

Breeding effort (number of egg masses produced when there was a spawning event) showed a bimodal pattern with a peak in October and another in February (Fig. 1). A season effect was also found for the breeding effort: there was twice as many egg masses produced in autumn than in spring (Fig. 2,  $F_{1,138}=6.8724$ ,  $p=0.01$ ). This was not due to bigger egg masses in autumn since we found that parsley frog tended to spawn smaller egg masses in autumn (Fig. 3,  $\chi^2_1=19,4043$ ,  $p<10^{-4}$ ).

### **Characteristics of temporal niches**

Temporal niches can be characterized from two points of view: the breeders' point of view taking, describing ponds when adult parsley frogs come to reproduce and the tadpoles' point of view, describing the ponds during the beginning of the larval period (3 months for autumn tadpoles and 1.5 months for spring ones) or the whole larval period.

From the breeder's point of view, composition of amphibian community, predator pressure and water physical parameters all varied between the spring and autumn spawning periods. First, ponds were larger in spring than in autumn: surface =  $97 \pm 147$  m<sup>2</sup> and depth  $50 \pm 39$  cm in autumn and  $172 \pm 198$  m<sup>2</sup> and  $79 \pm 47$  cm in spring (mean  $\pm$  SD among visits,  $F_{1,135}=6.1803$ ,  $p=0.014$  and  $F_{1,134}=14.751$ ,  $p=0.0002$ , for surface and depth, respectively, Table 1). The water temperature was warmer in autumn ( $18.6 \pm 4.1$  °C) than in spring ( $13.3 \pm 4.9$  °C) (mean  $\pm$  SD among visits,  $F_{1,79}=28.25$ ,  $p<10^{-6}$ , Table 1 and Annex B for temperature curve). Besides, there were three times as many notonectids in autumn than in spring ( $0.43 \pm 0.88$  and  $0.12 \pm 0.27$  insects per dipnet haul in autumn and in spring, respectively, Wilcoxon test,  $W=803$ ,  $p=0.02$ , Table 1) but the density of dragonfly larvae (Anisoptera) was similar ( $0.68 \pm 3.21$  and  $0.34 \pm 0.75$  insects per dipnet haul, in autumn and in spring, respectively  $W=617.5$ ,  $p=0.93$ , Table 1). There were more adult newts in the ponds in spring than in autumn ( $0 \pm 0$  newt per pond in autumn and  $1.4 \pm 3.2$  in spring,  $W=1608$ ,  $p<10^{-6}$ , Table 1).

Moreover, there was no significant difference of competition pressure (intra and interspecific) in the ponds between the two seasons when adults came to breed, even if some larvae were more abundant in one season (*Pelodytes punctatus* and *Bufo calamita* in autumn, *Hyla meridionalis* in spring).

Nevertheless, when considering the density of amphibian larvae encountered by parsley frog tadpoles during the beginning of their larval development, we found that spring tadpoles shared their habitat with 13-fold more amphibian larvae of other species ( $0.59 \pm 1.96$  and  $7.75 \pm 21.22$  amphibian larvae per dipnet haul, in autumn and in spring, respectively, Wilcoxon test,  $W=271.5$ ,  $p=0.022$ ). This is also true when considering the whole larval period. Interestingly, the density of conspecific larvae, adult newts and invertebrate predators faced during larval life was similar for autumn and spring tadpoles.

### **Factors influencing oviposition and breeding effort**

The frequency of breeding episodes (probability to find new clutches) varied greatly among sites ( $\chi^2_{18}=49.5$ ,  $p<10^{-4}$ ). In both autumn and spring, this breeding probability was best explained by the month, the surface of the ponds (considering only ponds filled with water) and the density of parsley frog tadpoles (considering AIC values, Table2). The surface of the pond had a positive effect on breeding probability. In spring, when parsley frog tadpoles were separated into large autumn tadpoles and small spring tadpoles, we found that the model containing the density of small spring tadpoles was better than the one with the density of large tadpoles (Table 2). In both seasons, the density of parsley frog tadpoles had a negative effect on breeding probability.

When considering breeding effort (when there was at least one egg mass observed during the visit), we found that none of the explanatory variables tested (surface, intra and interspecific competition and predation) had a significant effect.

Finally, the presence of predators (adult newts and insects) and competitors (larvae of other anuran species) present in the pond during the year had no significant effect both on the spawning probability and breeding effort.

### **Offspring survival**

The probability of breeding success (producing at least one metamorph) for one given breeding event is not different in autumn and in spring over the two years ( $0.286 \pm 0.456$  in autumn and  $0.211 \pm 0.417$  in spring, binomial GLM,  $\chi^2_1 = 0.71$ ,  $p=0.4$ ). Within sites, breeding success was not significantly different between season ( $0.47$  in autumn and  $0.45$  in spring, binomial GLM,  $\chi^2_1 = 0.61$ ,  $p=0.4$ ) and was affected by the drought of the pond after hatching (Fig. 4). But as there could be several breeding events in one pond during one season, the failure of one breeding event can be counterbalanced by the success of another breeding event (Fig. 4). The overall survival (as the ratio of metamorphs produced over the number of eggs laid) was low ( $0.019 \pm 0.05$ ) and was not different between seasons (ANOVA on transformed data,  $F_{1,117}=0.148$ ,  $p=0.7$ , Fig. 5).

In spring, the overall survival of spring tadpoles, for a given breeding event, was reduced in the presence of parsley frog tadpoles laid in autumn ( $0.031 \pm 0.63$  and  $0.0031 \pm 0.11$  without and with older autumn tadpoles, respectively,  $F_{1,60}=4.4359$ ,  $p=0.039$ , Fig. 6). This negative effect of the spring cohort by the autumn cohort contribute to a typical pattern observed on ponds: except in one pond, only one cohort per year could reach metamorphosis in one site meaning that the spring breeding was successful only if the autumn breeding failed (Fig 8,  $\chi^2_1 = 5.0879$ ,  $p=0.024$  over the two years, Fig. 7).

The hatching rate changed over months: in autumn, the hatching rate was higher in September and October whereas in spring, it was higher in March ( $F_{6,115}=2.21$ ,  $p=0.047$ , Fig. 8). The hatching rate was slightly higher in autumn but this difference was not significant

( $F_{1,120}=3.64$ ,  $p=0.059$ , Fig. 5). In spring, the hatching rate decreased in the presence of parsley frog tadpoles laid in autumn but this effect was not significant ( $(0.14 \pm 0.23$  and  $0.088 \pm 0.19$  without and with older autumn tadpoles, respectively,  $F_{1,62}=0.948$ ,  $p=0.33$ ).

Larval survival did not differ between seasons ( $F_{1,50}=2.95$ ,  $p=0.09$ , Fig. 5). In spring, the larval survival was not influenced by the presence of older tadpoles ( $F_{1,17}=0.19$ ,  $p=0.67$ ).

For both hatching rate and larval survival, we found no effect of predation or competition.

Over the two-year survey, we found that autumn breeding produced more metamorphs than spring breeding but this difference was not significant since there was a large variance among sites (76% of the metamorphs originated from autumn laid eggs,  $\chi^2_1=2.87$ ,  $p=0.09$ ).

## DISCUSSION

Field survey enabled us to reveal the temporal partition of breeding niches made by this species and describe the costs and benefit associated to the use of temporal niches. Parsley frog produced more eggs in autumn than in spring. The egg produced have higher hatching rate in autumn but the larval survival was (not significantly) higher in spring. Thus the overall survival doesn't differ between the two seasonal niches. However, we revealed a striking negative effect of the presence of autumn laid tadpoles on the overall survival of spring offspring. This leads to a quasi total exclusion of the spring cohort by the autumn cohort: thus spring breeding is successful only when autumn breeding has failed. Nonetheless, we found no indication of site selection by breeders to avoid conspecifics.

### Breeding phenology

The breeding pattern characterized with two seasonal peaks is similar to what was previously described in Mediterranean regions and was explained by the favourable climatic conditions (Toxopeus, Ohm et al. 1993; Guyétant, Temmermans et al. 1999; ACEMAX-coll., Duguet et

al. 2003; Jakob, Poizat et al. 2003). It is probable that the timing of reproduction responds to a trade-off between adult and larvae requirements. From the adult point of view, breeding is highly costly for both males (chorus) and females (eggs). The onset of reproduction is probably limited by the beginning of more energetically favourable conditions for the parents (in the case of an income breeder) or to the accumulation of sufficient energy stores to breed (for a capital breeder). It is not known if parsley frog is an income or rather a capital breeder. Parsley frog tadpole requirement is mainly a sufficient time to grow and differentiate before the pond dry.

### **Seasonal effects on breeding success**

The observed survival rates were closed to what was reported on several other amphibian species (Beebee 1996). We found no significant difference in overall survival between the two seasons but hatching rate was higher in autumn. Parsley frog uses temporary ponds that refill in September and October but may dry during autumn or later in late spring (May or June). Thus adults have to face two constraints to ensure the survival of their offspring. In autumn the ponds filled with water are less frequent and usually smaller and early drought may happen causing premature death of the larvae. However this constraint is also present in spring, even if it is easier to find a suitable pond to breed in spring, since the larvae may die from desiccation before metamorphosis. Our results showed the effect of pond drying on survival for both autumn and spring laid individuals. In the field, we observed that in autumn parsley frog can breed in very small water bodies (sometimes even puddles) where they face a high risk of failing. In May or June we frequently observed dead tadpoles that failed metamorphosing before the pond dried out.

The predation pressure seemed to be quite similar between seasons since the major predator, dragonfly larvae (Odonata: Aeshnidae), was present in both periods. Moreover, adult newts

and notonectids have a lower impact on tadpoles and have opposite patterns of densities between seasons (Van Buskirk and Arioli 2005). The other major predators (Dytiscidae and *Natrix maura*, viperine snake) are scarce and even absent from very small ponds. Besides, we found no effect of predation on tadpole survival even if the predation pressure varies from site to site. This may seem surprising since many studies showed that, in addition to morphological plastic response, predation cause substantial mortality to tadpole populations (for e.g. Tejedo 1993; Van Buskirk and Arioli 2005). It may be due to the lack of information about predation during the first year of survey or to the rough estimate of survival impeding our ability to detect a potential effect of predators. Nevertheless, our results suggest that the predation pressure is probably not a stronger constraint in one temporal niche than in the other.

We found no effect of interspecific competition on survival within each season. We examined the presence of all species belonging to the local amphibian community and showed that the composition of this community changed over year in the pond as is well known (Richter-Boix, Llorente et al. 2006; Geniez and Cheylan in prep). Spring tadpoles have to face more competitors during their development than autumn tadpoles since the majority of amphibian species in the local community breed in March and April. However, competition is high only at the end of their larval development when tadpoles are probably less vulnerable. Richter-Boix and colleagues showed very clearly that parsley frog is a poor competitor as tadpole: it outcompetes only *Bufo bufo* and *Bufo calamita* (Richter-Boix, Llorente et al. 2007). *Bufo calamita* is the only species, with parsley frog, that uses very small artificial ponds thus it is not unexpected that they can cohabit with little cost for the two species. We suggest that competition effect is not observed in our study since parsley frog avoids the spatial and temporal niches of its competitors.

### **Priority effects**

We observed that the presence of older conspecifics laid in autumn decreases the survival of spring tadpoles. The same trend was observed in hatching rate, although not significant. In the field, we observed in several occasions that big autumn tadpoles were eating freshly laid eggs of their own species and this could explain the lower hatching rate of spring eggs in presence of autumn tadpoles. Moreover, Tejedo (1991) previously described in much detail that parsley frog tadpoles ate *Bufo calamita* eggs (Tejedo 1991). Predaceous tadpoles were exclusively old tadpoles (Gosner stage 35-38, snout-vent length =  $15.41 \pm 1.07$  mm and Gosner stage 26-28, snout-vent length =  $9.26 \pm 1.08$  mm) and they can cause a loss of 50 to 100% of the eggs laid (Tejedo 1991). Cannibalism on eggs has been described on some anuran species (Summers 1999; Dayton and Wapo 2002) and have been proposed as an energetic opportunistic response in food-limited temporary ponds. We still don't know if autumn tadpoles affect the larval survival of spring tadpoles. Nevertheless, this phenomenon has a great impact on the overall efficiency of breeding: as we showed, in one pond there could be only one successful breeding period, autumn or spring, rarely both.

### **Constraints on oviposition and breeding effort**

We showed that the breeding effort was higher, by two-fold, in autumn than in spring. This is in apparent contradiction with previous studies: for example, Richter-Boix *et al* found that spring breeding effort was four-fold higher than autumn breeding effort (Guyétant, Temmermans et al. 1999; Richter-Boix, Llorente et al. 2006). The breeding effort is not influenced by the presence of old conspecifics. Surprisingly, we found a negative correlation between the density of parsley frog tadpoles and the breeding probability. This is probably simply linked to the fact that, once all females have laid eggs, there is little chance to see any more eggs.



## Conclusion

Since breeding effort is higher in autumn and survival does not differ between seasons, the autumn niche produces more juveniles every year than spring niche. Besides, we demonstrated in another study that autumn juveniles leaved the pond sooner and at larger size than spring juveniles, increasing again the potential success of autumn breeding (Jourdan-Pineau, David et al. 2010).

We also showed previously that autumn and spring tadpoles are genetically indistinguishable indicating that autumn and spring breeding doesn't correspond to two distinct temporal populations (Jourdan-Pineau, Crochet et al. 2010). Individual breeding strategies are still unknown in this species but it is possible that an individual breed both in autumn and in spring. If adults share their breeding effort between the two temporal niches, this may constitute a typical bet-hedging strategy which is expected to evolve in such unpredictable environments (Philippi and Seger 1989; Saiah and Perrin 1990). This may be seen as a risk spreading strategy since each seasonal breeding may result in a total failure. Breeding both in spring and in autumn spread would therefore decrease the variance of fitness. It could also be possible that individual breeding strategies are purely opportunistic and breed when they are energetically ready to. Such hypothesis relies on the inability to store energy reserves of to delay egg spawning. Therefore it is needed to study the individual breeding strategies in parsley frog to complete our understanding of its breeding phenology and evaluate its potential evolution.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by a grant from Agence Nationale de la Recherche (SCOBIM JCJC 0002). We are grateful to Vincent Mouret, Alain Fizesan, Denis Rey, Simon Russeil and Jérémy Aubain who did field work. Thanks to Joëlle Caillibotte and many anonymous land owners who allow us to work on their ponds.

## REFERENCES

- ACEMAV-coll., R. Duguet, et al. (2003). Les amphibiens de France, Belgique et Luxembourg. Mèze (France).
- ACEMAX-coll., R. Duguet, et al. (2003). Les amphibiens de France, Belgique et Luxembourg. Mèze (France).
- Anders, A., D. B. Martin, et al. (2001). "Intraspecific resource partitioning in brown trout: the temporal distribution of foraging is determined by social rank." Journal of Animal Ecology **70**(6): 980-986.
- Beebee, T. J. C. (1996). Ecology and conservation of amphibians. London, Chapman & Hall.
- Blaustein, L. and J. Margalit (1996). "Priority effects in temporary pools; Nature and outcome of mosquito larva toad tadpole interactions depend on order of entrance (vol 65, pg 77, 1996)." Journal of Animal Ecology **65**(3): 400-400.
- Bruseo, J. A. and R. E. Barry, Jr. (1995). "Temporal Activity of Syntopic Peromyscus in the Central Appalachians." Journal of Mammalogy **76**(1): 78-82.
- Carothers, J. H. and F. M. Jaksic (1984). "Time as a Niche Difference - the Role of Interference Competition." Oikos **42**(3): 403-406.
- Cronin, J. T. and J. Travis (1986). "Size-Limited Predation on Larval Rana areolata (Anura: Ranidae) by Two Species of Backswimmer (Insecta: Hemiptera: Notonectidae)." Herpetologica **42**(2): 171-174.

- Crump, M. L. (1991). "Choice of Oviposition Site and Egg Load Assessment by a Treefrog." Herpetologica **47**(3): 308-315.
- David, P. and P. Jarne (1997). "Context-dependent survival differences among electrophoretic genotypes in natural populations of the marine bivalve *Spisula ovalis*." Genetics **146**(1): 335-344.
- Dayton, G. H. and S. D. Wapo (2002). "Cannibalistic behavior in *Scaphiopus couchii*: more evidence for larval anuran oophagy." Journal of Herpetology **36**(3): 531-532.
- Diaz-Paniagua, C. (1988). "Temporal segregation in larval amphibian communities in temporary ponds at a locality in SW Spain." Amphibia-Reptilia **9**: 15-26.
- Eitam, A., B. Leon, et al. (2005). "Density and Intercohort Priority Effects on Larval *Salamandra salamandra* in Temporary Pools." Oecologia **146**(1): 36-42.
- Geniez, P. and M. Cheylan (in prep). Les Amphibiens et Reptiles du Languedoc-Roussillon et régions limitrophes. Atlas biogéographique. Meridionalis. Mèze.
- Guyétant, R., W. Temmermans, et al. (1999). "Phenology of the reproduction of *Pelodytes punctatus* Daudin, 1802 (Amphibia, Anura)." Amphibia-Reptilia **20**(2): 149-160.
- Halloy, M. (2006). "Choice of oviposition site in *Pleurodema borellii* (Leptodactylidae): importance of conspecific tadpole size." South American Journal of Herpetology **1**(1): 72-78.
- Halloy, M. and J. M. Fiano (2000). "Oviposition site selection in *Pleurodema borellii* (Anura : Leptodactylidae) may be influenced by tadpole presence." Copeia(2): 606-609.
- Jakob, C., G. Poizat, et al. (2003). "Breeding phenology and larval distribution of amphibians in a Mediterranean pond network with unpredictable hydrology." Hydrobiologia **499**(1-3): 51-61.
- Joly, P., A. Morand, et al. (2005). "Canalization of size at metamorphosis despite temperature and density variations in *Pelodytes punctatus*." Herpetological Journal **15**(1): 45-50.

- Jourdan-Pineau, H., P. A. Crochet, et al. (2010). "Autumn or spring spawning: impact of breeding phenology on larval fitness in Parsley frog, *Pelodytes punctatus*." in prep.
- Jourdan-Pineau, H., P. David, et al. (2010). "Plastic rather than genetic differences between seasonal breeding cohorts in Mediterranean Parsley frog, *Pelodytes punctatus*." submitted.
- Lawler, S. P. and P. J. Morin (1993). "Temporal Overlap, Competition, and Priority Effects in Larval Anurans." Ecology **74**(1): 174-182.
- Manly, B. F. J. (1985). The Statistics of Natural Selection on Animal Populations.  
. London., Chapman and Hall.
- Paris, M. G. (1985). Los anfibios de Espana. Madrid, Publicaciones de extension agraria.
- Philippi, T. and J. Seger (1989). "Hedging Ones Evolutionary Bets, Revisited." Trends in Ecology & Evolution **4**(2): 41-44.
- R-Development-Core-Team (2008). R: A language and environment for statistical computing.  
. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Richter-Boix, A., G. A. Llorente, et al. (2006). "Breeding phenology of an amphibian community in a Mediterranean area." Amphibia-Reptilia **27**(4): 549-559.
- Richter-Boix, A., G. A. Llorente, et al. (2007). "A comparative study of predator-induced phenotype in tadpoles across a pond permanency gradient." Hydrobiologia **583**: 43-56.
- Richter-Boix, A., G. A. Llorente, et al. (2007). "Hierarchical competition in pond-breeding anuran larvae in a Mediterranean area." Amphibia-reptilia **28**(2): 247-261.
- Ryan, T. J. and G. R. Plague (2004). "Hatching asynchrony, survival, and the fitness of alternative adult morphs in *Ambystoma talpoideum*." Oecologia **140**(1): 46-51.
- Sadeh, A., M. Mangel, et al. (2009). "Context-dependent reproductive habitat selection: the interactive roles of structural complexity and cannibalistic conspecifics." Ecology Letters **12**(11): 1158-1164.

- Saiah, H. and N. Perrin (1990). "Autumnal Vs Spring Hatching in the Fairy Shrimp Siphonophanes-Grubii (Dybowski) (Crustacea, Anostraca) - Diversified Bet-Hedging Strategy." Functional Ecology **4**(6): 769-775.
- Salvador, A. and M. G. Paris (2001). Anfibios Españoles.
- Summers, K. (1999). "The effects of cannibalism on Amazonian poison frog egg and tadpole deposition and survivorship in Heliconia axil pools." Oecologia **119**(4): 557-564.
- Tejedo, M. (1991). "Effect of Predation by 2 Species of Sympatric Tadpoles on Embryo Survival in Natterjack Toads (Bufo-Calamita)." Herpetologica **47**(3): 322-327.
- Tejedo, M. (1993). "Size-Dependent Vulnerability and Behavioral-Responses of Tadpoles of 2 Anuran Species to Beetle Larvae Predators." Herpetologica **49**(3): 287-294.
- Toxopeus, A. G., M. Ohm, et al. (1993). "Reproductive biology of the parsley frog, Pelodytes punctatus, at the northernmost part of its range." Amphibia-Reptilia **14**: 131-147.
- Travis, J., W. H. Keen, et al. (1985). "The Role of Relative Body Size in a Predator-Prey Relationship between Dragonfly Naiads and Larval Anurans." Oikos **45**(1): 59-65.
- Van Buskirk, J. and M. Arioli (2005). "Habitat specialization and adaptive phenotypic divergence of anuran populations." Journal of Evolutionary Biology **18**(3): 596-608.
- Vignoli, L., M. A. Bologna, et al. (2007). "Spatio-temporal resource use at a microhabitat scale in an amphibian community at a pond in Mediterranean central Italy." Vie Et Milieu-Life and Environment **57**(3): 159-164.

## FIGURE LEGENDS

Fig 1: Mean monthly reproductive effort (in number of egg masses produced when there was a breeding event, error bars are standard deviations among sites, among years). Black bars and grey bars represent data collected in 2007/2008 and 2008/2009, respectively

Fig 2: Mean reproductive effort per season (in total number of egg masses produced when there was a breeding event, error bars are standard deviations, among sites, among year ). Autumn in grey and spring in black.

Fig3: Proportion of small (75 eggs in average, white bars), medium (150 eggs in average, black bars) and big (250 eggs in average, grey bars) clutches produced in each season

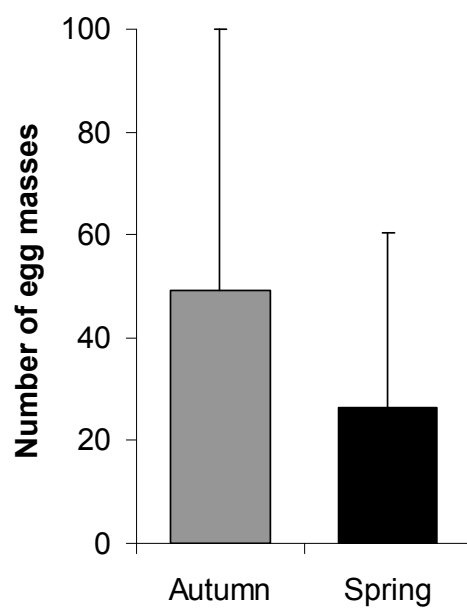
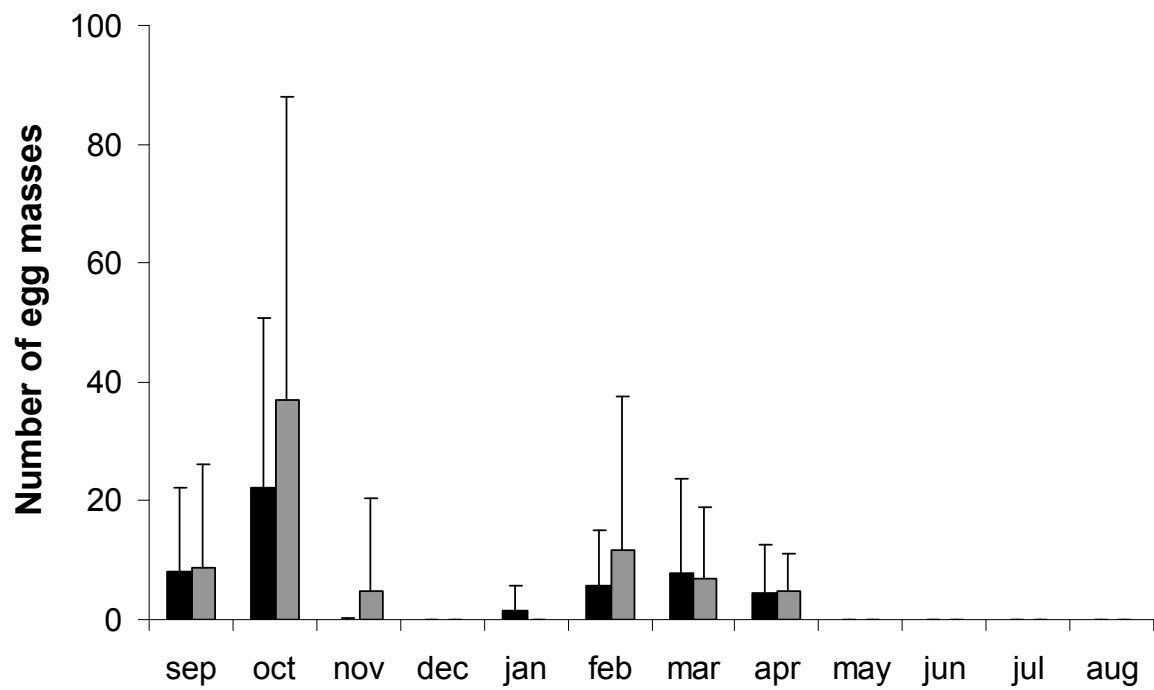
Figure 4: Breeding success of a site (0 or 1, depending if any metamorph was produced in the site for the considered season) in autumn (A, left) and spring (S, right) for the first (A1 and S1) and the second (A2 and S2) year of the field survey. “Rescued” means that there was at least one breeding event following the failure that successfully produced metamorphs.

Figure 5: Mean ( $\pm$  S. D) survival during embryonic stages (as proportion of eggs laid), larval stages (as proportion of eggs hatched) and from eggs to juveniles (as proportion of eggs laid) in autumn (grey bars) and spring (black bars)

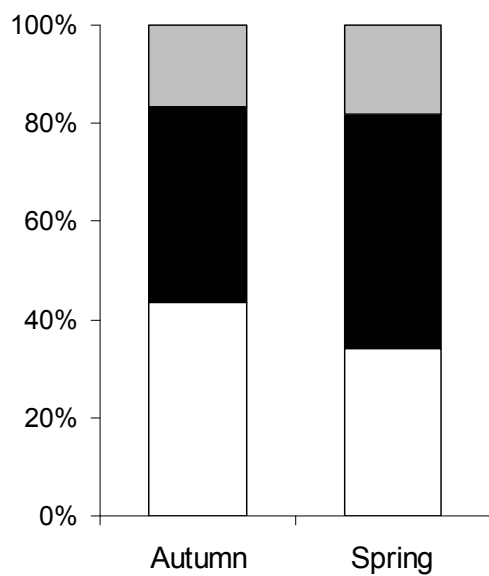
Figure 6: Mean ( $\pm$  S. D) overall survival (number of metamorphs produced as a proportion of eggs laid) in spring in presence (with) or absence (without) of older tadpoles laid in autumn

Figure 7: Success (white) or failure (black) of autumn (A) and spring (S) breeding events for one site (in one box) in 2007/2008 (first line) and 2008/2009 (second line). Grey squares with a cross indicate no breeding event during the season. The only site where spring cohort managed to develop in presence of older autumn tadpoles is S13 in the 2008/2009 season.

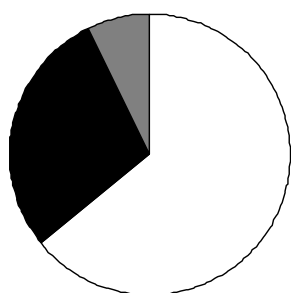
Fig 8: Mean ( $\pm$  S. D) hatching rate (as proportion of eggs laid) for each month



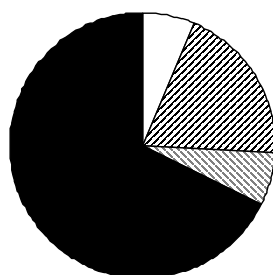




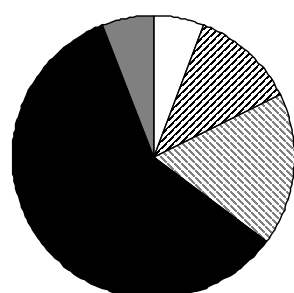
**A1**



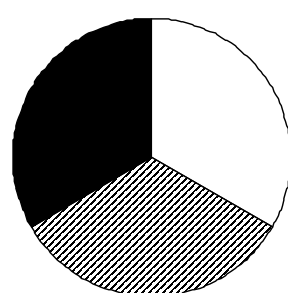
**S1**



**A2**



**S2**



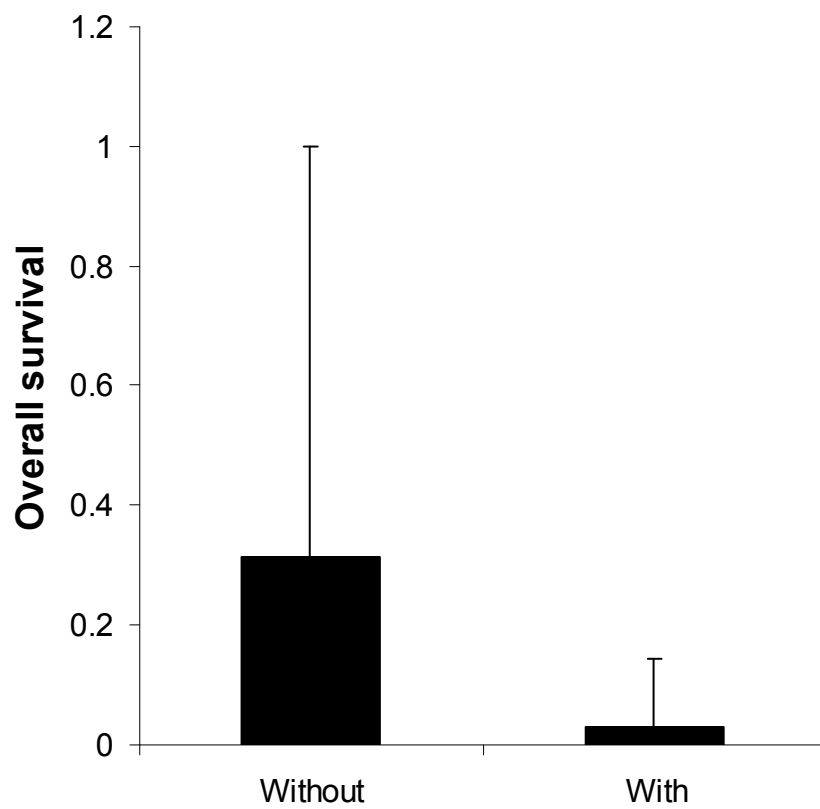
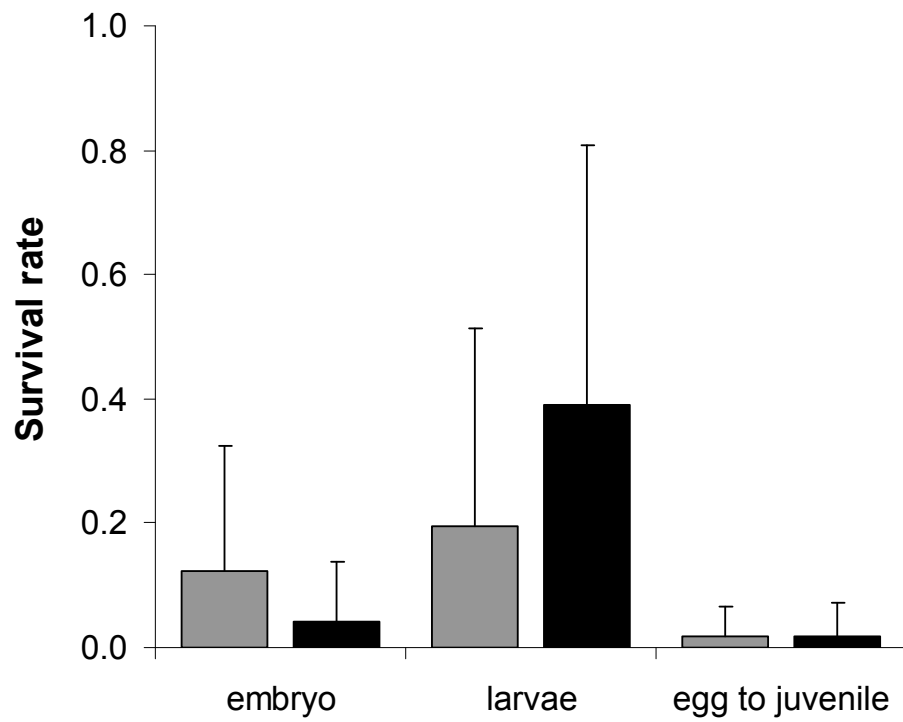
□ Succes

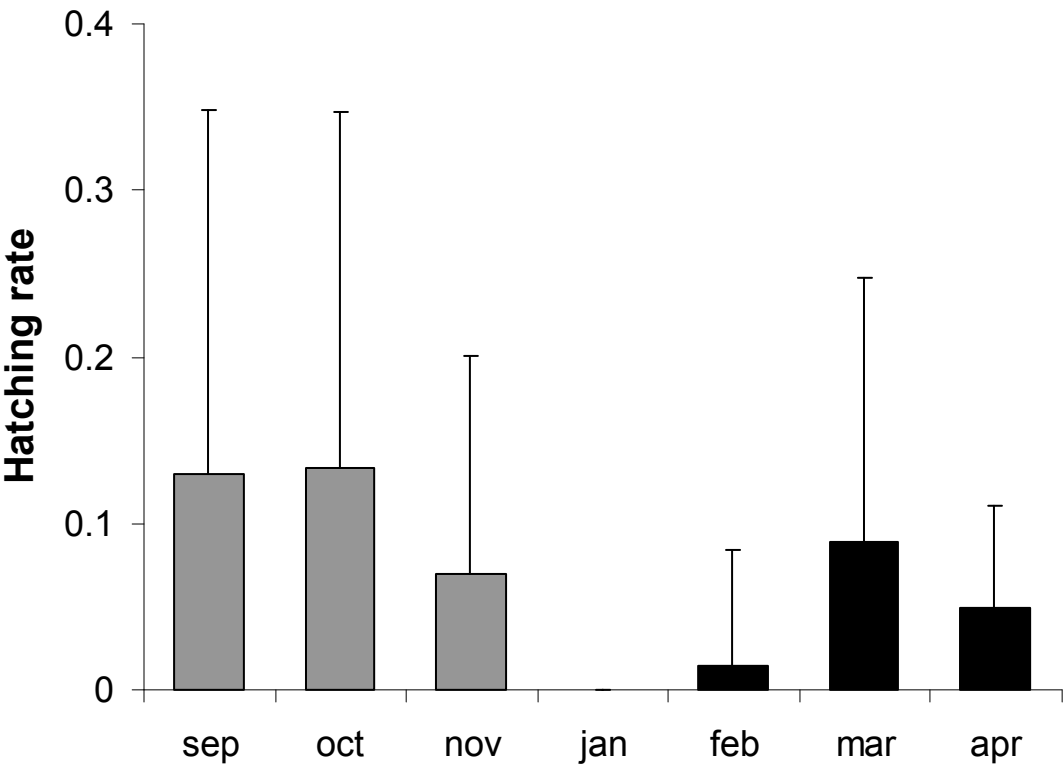
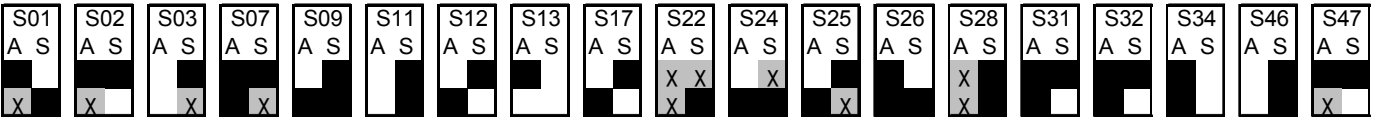
▨ Failure without pond drying rescued by a second successful breeding

▩ Failure caused by pond drying rescued by a second successful breeding

■ Failure without pond drying

■ Failure caused by pond drying





Parameters	Autumn		Spring		DF num	DF den	F	W	p
	mean	SD	mean	SD					
surface	97	147	172	198	1	135	6.1803		0.01
depth	50	39	79	47	1	134	14.751		0.0002
temperature	18.6	4.1	13.3	4.9	1	79	28.25		<10 <sup>-6</sup>
notonectids	0.43	0.88	0.12	0.27				803	0.02
adult newts	0	0	1.4	3.2				1608	<10 <sup>-6</sup>

Table 1: Description of the ponds during each season using parameters registered during the visits where there were egg masses in the ponds. Only significant differences are shown (see text for further details). ANOVAs were used for physical parameters (degree of freedom and F values are given) and Wilcoxon tests are used for density of predators (W values).

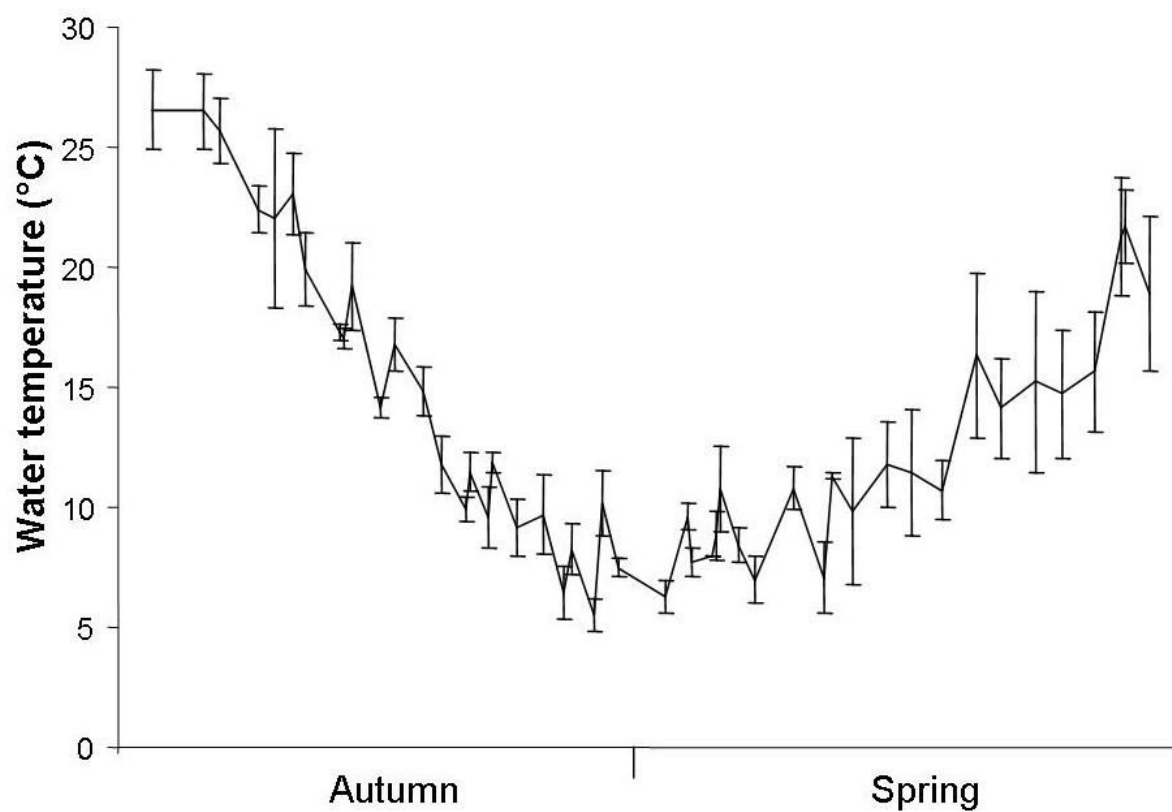
Season	Factors (+ ~Site)				AIC	Res Dev	DF
	M	S <sup>2</sup>	DensityS	Density L			
Spring	X	X	X		309.3	293.3	305
	X	X	X	X	310.2	292.2	304
	X				312.8	298.8	307
	X	X			314.5	300.5	306
	X	X		X	316.7	300.7	305
	X		X		323.2	317.2	306
					327.7	323.7	311
Autumn	X	X	X		193.3	179.5	262
	X	X			197.1	185.1	263
	X		X		204	192	263
	X				205.3	195.3	264
					262.3	258.3	268

Table 2: Models explaining breeding probability (Binomial mixed effects models). Each model has the same site random effect. M, S<sup>2</sup>, S and L mean month, surface, small (tadpoles) and large (tadpoles). Large tadpoles are not present in autumn. Interaction terms were all non significant. The line with no cross indicates the null model.

Annex A: Surveyed ponds (n°, names and area) and their geographic localization.

N°	Pond name	Area	Latitude	Longitude
S01	Pataris	Cournonterral	43.5694	3.6951
S02	Fertalière	Cournonterral	43.569	3.6812
S03	Logis du Bois	Notre-Dame de Londres	43.8406	3.7462
S07	Jasses	Notre-Dame de Londres	43.8657	3.7828
S09	SEGA	Notre-Dame de Londres	43.8147	3.7817
S11	Fesq	Notre-Dame de Londres	43.8028	3.7919
S12	Bouillés Ouest	Cournonterral	43.5694	3.6951
S13	Bergerie	Cournonterral	43.5803	3.7019
S17	Combe l'Escure	Cournonterral	43.5733	3.6994
S22	Pioch noir	Gardiole	43.4947	3.7544
S24	GMP	Cazevieille	43.7708	3.7945
S25	PMP	Cazevieille	43.7708	3.795
S26	Seuilles	Cazevieille	43.7597	3.7772
S28	Anduze	Gardiole	43.4787	3.7318
S31	Farlet	Gardiole	43.4908	3.7415
S32	Pierre Tintante	Gardiole	43.4826	3.7341
S34	Roubiac	Cazevieille	43.7597	3.7879
S46	Boissière	Notre-Dame de Londres	43.8337	3.7461
S47	Mège	Gardiole	43.4936	3.7544

Annex B: Water temperature (mean  $\pm$  SD within visits, between ponds) during the second year of field survey



## Chapitre 4

---

# Reproduction et traits larvaires au printemps ou en automne : origine génétique ou plastique ?

Dans le chapitre précédent, on a montré que les deux périodes de reproduction sont réellement exploitées et produisent des descendants. Une des questions centrales de cette thèse est de savoir comment ce système va évoluer. Ceci nécessite de connaître les bases des variations phénotypiques observées (que ce soit pour la phénologie de reproduction ou pour le développement larvaire). Deux hypothèses s'affrontent ici. Premièrement, les individus se reproduisant en automne et ceux se reproduisant au printemps peuvent simplement appartenir à une même population **panmictique** et toutes les différences phénotypiques observées peuvent être d'origine plastique. Alternativement, il peut exister, au sein d'un même site, deux populations temporelles de Pélodytes associées chacune à une période de reproduction.

Ceci a été réalisé à l'aide de deux approches complémentaires : des marqueurs moléculaires et une expérience de quasi "common garden". La première approche recherche une réduction du flux de gènes entre les cohortes d'automne et de printemps, pré-requis pour une adaptation temporelle des **phénotypes**. L'approche en conditions contrôlées permet de savoir s'il existe des différences adaptatives entre les cohortes, en réduisant (idéalement en éliminant) les variations environnementales à l'origine de différences plastiques entre les **phénotypes**. Dans cette dernière approche, on attend de ne trouver aucune différence entre les traits larvaires en laboratoire, contrairement au terrain (plus longue vie larvaire et plus grande taille à la métamorphose pour des individus d'automne) , si toutes les différences sont plastiques.

Les marqueurs neutres montrent très bien que la structure existant dans notre échantillonnage est d'origine spatiale et non temporelle. Les cohortes d'automne et de printemps ne peuvent pas être distinguées sur des bases génétiques. Les expériences d'élevage en conditions contrôlées vont dans le même sens et révèlent que les différences observées sur le terrain ne peuvent être que plastiques. En effet, lorsque les cohortes sont élevées

dans les mêmes conditions, elles présentent des tailles à la métamorphose similaires et une très légère différence de temps de vie larvaire due à une petite variation de température entre les deux expériences.

Ce travail ouvre la voie à plusieurs études. La première consiste à comprendre quelles sont les bases des variations de développement larvaire observées sur le terrain : quels sont les paramètres de l'environnement qui induisent ces différences et comment ? Ce point est partiellement abordé dans le chapitre 5 (les mécanismes physiologiques précis sont hors de notre étude). Les autres pistes sont l'étude des stratégies individuelles de reproduction. En effet, nous venons de montrer qu'il n'y a sûrement pas de stratégie fixée pour un **génotype** donné et ceci permet d'envisager de nombreuses possibilités : un adulte peut se reproduire de façon fixe toujours à la même saison, se reproduire aux deux saisons chaque année ou changer d'année en année. Enfin, le fait que la seule plasticité permette au Pélodyte de se reproduire efficacement (c'est à dire en produisant des descendants viables) dans des conditions très contrastées indique qu'il est sûrement capable de résister aux variations de son environnement.



**Phenotypic plasticity explains differences in larval life-history traits between seasonal breeding cohorts in the Mediterranean Parsley Frog *Pelodytes punctatus***

HELENE JOURDAN-PINEAU<sup>1</sup>,

PATRICE DAVID<sup>1</sup> and PIERRE-ANDRE CROCHET<sup>1</sup>

1: Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5175 CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France

**Submitted to Molecular Ecology**

*Received:*

*Keywords:* genetic differentiation, larval development, amphibian, anuran

Running title: Plastic breeding phenology of *P. punctatus*

*Correspondence:* Hélène Jourdan-Pineau, CEFE, UMR 5175 CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France; Fax: (+33) 4 67 41 21 38; Email: [helene.jourdan@cefe.cnrs.fr](mailto:helene.jourdan@cefe.cnrs.fr)

## ABSTRACT

Among life history traits, phenology is highly exposed to any temporal or spatial change in natural selection. Phenological changes are frequently continuous but discrete patterns are sometimes observed. They could result from phenotypic plasticity or genetic adaptation. In Mediterranean regions, spring and autumn constitute two climatically favourable breeding periods. In particular, among Mediterranean amphibian species, parsley frog, *Pelodytes punctatus* uses both temporal niches to breed. To determine whether this breeding pattern reflects the existence of two genetically differentiated sub-populations or if the bimodal phenology arises from purely plastic choice of a panmictic population, we use two complementary approaches: a survey of molecular genetic structure and common garden experiments on spring and autumn cohorts from several sites. We found that samples were genetically differentiated among sites but not between seasonal cohorts. Moreover, we showed that differences in tadpole life-history observed in the field between autumn and spring cohorts were not maintained when these cohorts were raised in similar laboratory conditions. We conclude that the two breeding periods of Parsley frog do not reflect two temporal subpopulations but rather a phenotypically plastic bet-hedging reproductive strategy.

## INTRODUCTION

Species survival on the long term depends on responses to both spatial and temporal changes in natural selection (e.g. (Kelly, 1992). More precisely, adaptation to various and varying constraints enables species to enlarge their distribution range (Kirkpatrick, Barton, 1997) or to persist despite climate changes (Parmesan, 2006; Walther *et al.*, 2002). Two mechanisms allow this appropriate response to changes in natural selection : microevolution (that is genetic adaptation at the population level) or phenotypic plasticity (at the individual level) (Charmantier *et al.*, 2008).

Life history traits are, by definition, greatly exposed to changes in selection and among those traits, phenology is specially important. Most phenological changes observed so far are gradual, for example earlier flowering or earlier egg laying in response to climate warming (Miller-Rushing, Primack, 2008; Møller, 2008). However, changes in climatic regime or geographic range may also result in discrete fitness peaks. For example, in the Mediterranean region two climatically favourable seasons (mild temperature and abundant precipitations in spring and autumn) are temporally isolated by a cold and dry period (winter) and a very dry and hot period (summer). Annual Mediterranean plants are thus adapted to one or the other temporal niche (even if most species flower in spring) (Pilar, Gabriel, 1998) but some species manage to use both temporal niches (Gratani, Crescente, 1997). Similarly, some equatorial birds have evolved bimodal reproduction in response to resource availability (Miller, 1962).

Recent phenotypic changes have been shown to result from both genetic adaptation and phenotypic plasticity. For example, in collared flycatchers (*Ficedula albicollis*) changes in breeding phenology, linked to climatic variation, were due to phenotypic plasticity (Przybylo *et al.*, 2000). On the other hand, Ramstad *et al* revealed genetic differences between early and late run of sockeye salmon cohorts ((Ramstad *et al.*, 2003), see also (Hendry, Day, 2005) for a review on population structure due to breeding time). Such genetic divergence in breeding

phenology could ultimately lead to allochronic sympatric speciation even if such mode of speciation has rarely been demonstrated in nature (but see for example (Bush, 1975; Friesen *et al.*, 2007; Yamamoto, Sota, 2009). Most studies assessing the origin of change in breeding time dealt with gradual phenological variation rather than discrete temporal strategies. Little is known about how species can deal with long gaps between periods of favourable breeding conditions. Such gaps tend to challenge both genetic adaptation and plasticity processes because they require a "jump" in the phenotypic space. A more precise knowledge of genetic bases underlying discontinuous variation in phenology is therefore needed. Moreover, large contrasts in phenology are often associated to contrasted life histories and sometimes conflicting tolerance requirements, such as offspring survival under cold (winter) or hot (summer) conditions.

We here assess the bases of phenotypic differences in phenology and associated life-history variation observed between cohorts in a species showing a bimodal reproduction. We study the Parsley frog, *Pelodytes punctatus*, which shows an extreme, bimodal variation in breeding date in Mediterranean regions: while most species of these regions are spring-breeders, Parsley frog (as well as Western Spadefoot Toad *Pelobates cultripes*) uses both spring and autumn temporal niches to breed (Guyétant *et al.*, 1999; Jakob *et al.*, 2003; Richter-Boix *et al.*, 2006). Autumn and spring breeding periods produce two cohorts exposed to very different conditions, as one of them has to overwinter as larvae while the other does not. This results in a large variation in the length of larval development (Guyétant *et al.*, 1999; Richter-Boix *et al.*, 2006). However, it is still not known whether these two seasonal cohorts reflect the existence within a pond of two genetically differentiated sub-populations (from “autumnal Parsley frogs” and “spring Parsley frogs” respectively) that would breed at two distinct periods (as was suggested to occur in *Bufo calamita* (Sinsch, 1992) or if the bimodal

phenology arises from a purely plastic choice in a panmictic population of opportunistic breeders. To choose between these two alternative hypotheses, we use two complementary approaches: we looked for the existence of two distinct sub-populations with neutral markers and we investigated differences in quantitative traits by mean of common garden experiments. Neutral genetic markers allow us to evaluate the amount of gene flow between seasonal cohorts: since a reduction of gene flow is a prerequisite to select for temporally adapted phenotypes, a lack of differentiation in neutral markers among seasonal cohorts would make genetic differences among seasonal cohorts unlikely. With common garden experiments, we assessed the extent to which differences between cohorts were genetic. If such differences partly reflect genetic processes, we expect that, when reared in similar conditions, autumn tadpoles will develop slower and metamorphose with a larger body size, as they do in the field, compared to spring tadpoles.

## MATERIAL AND METHODS

### *Study area*

The study area surrounds Montpellier (France, Hérault) and includes 11 ponds around Montpellier (Annex A). Five ponds were used for genotyping analyses among which two were also used for experimental lab rearing (Annex A). Six other ponds were included only in experimental lab rearing (Annex A). For further details on the studied areas, see (Jourdan-Pineau *et al.*, 2010).

### *Genetic sampling and genotyping for neutral molecular markers*

Tissue samples of tadpoles (tail fragments stored in 95% ethanol) were collected in five ponds between 2006 and 2008 and were assigned to either spring or autumn cohort depending on whether they originated from eggs laid in spring or autumn (see Annex A). Twenty-five to 63

individuals were sampled for each cohort in each site. A total of 464 individuals were genotyped. DNA was extracted using a Chelex method based on Walsh *et al* (1991) and adapted for tadpole tissue by Jourdan-Pineau *et al.* (2009). DNA was amplified by PCR and genotyped with two multiplex panels of 4 microsatellite markers: PPU2, PU5, PPU6, PPU10, PPU11, PPU15, PPU16 and PPU17 (Jourdan-Pineau *et al.*, 2009) in a genotyper ABI Prism 3100 sequencer (Applied Biosystems). Genotypes were eye-checked under GENMAPPER 3.0 software (Applied Biosystems). Typing error rate was estimated at around 3.5% (depending on the locus) based on 25 replicated genotypes.

#### *Genotype data analyses*

$F_{IS}$  and  $F_{ST}$  (Weir, Cockerham, 1984) values were computed with GENETIX (Belkhir *et al.*, 1996)), and their significativity tested with permutations. Allelic richness AR (averaged over all loci) was computed with FSTAT (Goudet, 1995); AR corresponds to observed allele numbers corrected by sample size (in our case, all are given for a reference sample size of 25). Tests of linkage disequilibrium were run with GENEPOP 4.0 (Raymond, Rousset, 1995; Rousset, 2008).

To test whether autumn-breeding and spring-breeding cohorts show genetic differentiation at neutral loci, we used a series of complementary approaches. We first compared the amount of genetic differentiation between seasonal cohorts within sites to the amount of genetic differentiation between sites using  $F_{ST}$  values. We also ran a molecular analysis of variance (AMOVA) in Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005) to test the relevance of two types of grouping: by season or by site. We performed a factorial correspondence analysis (FCA) on the whole genotype dataset using Genetix 4.05.2 to see how cohorts and sites are grouped based on allelic frequencies (Belkhir *et al.*, 1996). Last, the clustering method developed in STRUCTURE v.2.2 (Pritchard *et al.*, 2000) was used to test whether spring and autumn

individuals can be grouped together when the program is “forced” to classify individuals into two clusters. The effects of site and cohort in individual assignment (x) to one cluster was analysed, after arcsin( $\sqrt{x}$ ) transformation, with a two way ANOVA.

### *Laboratory experiment*

Lab experiments in controlled conditions were performed in 2009. For the first experiment on spring cohorts, two ponds were used: Roubiac and Farlet. In the second experiment on autumn cohorts, to allow for population comparison, we used the two same ponds (Roubiac and Farlet) and two other ponds (Pataris and Boissière). In each pond, 6 egg masses were collected and quickly brought to the lab where they were allowed to hatch (amphibians rearing facilities: Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, Montpellier).

After the developing embryos hatched, 10 tadpoles per clutch were reared until metamorphosis in 1-Liter individual plastic boxes with bottom replaced by small-meshed net. Experimental units consisted of 4 plastic tanks (surface: 1m<sup>2</sup>, depth: 10cm) filled with borehole water. To limit tank effects, water circulated between tanks. Individual boxes were placed in those big tanks so that tadpoles shared the same water. Tadpoles were fed *ad libitum* with rabbit chow (Lapina Finish from DP Nutrition). Water was changed every two weeks to avoid fouling. Temperature was maintained around 20°C in the two experiments (20.27 °C  $\pm$  0.24 in spring and 19.99  $\pm$  0.19 in autumn,  $p=0.39$ ). Photoperiod was set at 12/12 L/D.

Length of the larval period was considered as the time elapsed from hatching until forelimb protrusion at Gosner stage 42 (Gosner, 1960). Tanks were checked every two days and all metamorphs were collected and kept in their boxes with 5mm of water until tail resorption. Since larval period has often been shown to correlate with size at metamorphosis, we measured with a calliper snout-vent length (SVL) at metamorphosis after complete tail resorption at Gosner stage 46.

### *Statistical analyses of lab experiments*

All statistical analyses were performed with R (R-Development-Core-Team, 2008) and Jump 7.0 (SAS Institute Inc.). The analyses of lab data (larval period and size at metamorphosis) required the use of linear mixed models using site and clutch (family) nested in site as random effects (see Table 2). Larval period was not normally distributed so we did a  $\log(\text{larval period} - 20)$  transformation to obtain normal data and run the analysis. Nevertheless, as this data transformation didn't change the results of analyses, we decided to give the results obtained for raw values of larval periods.

## RESULTS

### *Standard population genetic analyses*

Allelic diversity ranged from 2 to 17 alleles (depending on the locus) over the whole sample and the mean allelic richness was  $4.5 \pm 0.6$  (mean  $\pm$  SE, see Table 1). All populations exhibited a significant heterozygote deficiency for at least one sampled cohort (Table 1). Heterozygote deficiency occurred at all loci and especially for PPU17 in all samples (Annex B for details on loci). Significant linkage disequilibrium occurred in only three sites (Fesq, Bergerie-Spring08 and particularly Montbazin), and then between all pairs of loci (for example, Montbazin in autumn 2007, see Annex C).

### *Genetic structure analyses*

$F_{ST}$  values between seasonal cohorts within a site showed a great variability ranging from 0 to 0.144 (mean  $\pm$  SE:  $0.049 \pm 0.050$ , Table 2). Those values were similar to those found between years within site and cohort ( $0.035 \pm 0.035$ , range: 0.006-0.09) and lower than those found



between sites within cohorts ( $0.102 \pm 0.047$ , range: 0.016-0.186) and between sites between cohorts ( $0.097 \pm 0.049$ , range: 0.025-0.274, Table 2). The analysis of molecular variance performed on Arlequin (Table 3) revealed that the genetic variance among samples (10% of the total) was better explained by grouping samples according to their site of origin and then subdividing sites into cohorts than the reverse. Sites explained a significant fraction of the genetic variance among samples (54%, equivalent to 5% of the total genetic variance) while cohorts did not (negative, and very small, estimate of variance explained).

The first two axes of the FCA explained 44.09 % of the variance (25.15 % and 18.94 % respectively). Inspection of the first factorial plane (Fig. 1) confirmed that samples were clustered according to sites but not according to cohorts (this was true also when including more axes, data not shown). Moreover, in sites where we sampled spring or autumn cohorts in two consecutive years, samples originating from the same season were not grouped (except in Bergerie). Finally, when STRUCTURE software was run for two clusters, the groups obtained did not separate individuals into temporal cohorts (Fig. 2, seasonal cohort effect:  $p=0.92$ , site effect:  $p<0.0001$ , interaction term:  $p=0.0004$ ).

### *Laboratory experiments*

When comparing the two populations (Farlet and Roubiac) with both autumn and spring clutches raised in similar conditions, we found no significant difference in SVL at metamorphosis (Gosner stage 46) between cohorts ( $15.2 \pm 0.1$  mm in autumn and  $15.4 \pm 0.2$  in spring,  $p=0.29$  Fig. 3, Table 4 and Annex D). These SVL values were close to those found in field survey for spring cohort ( $14.7 \pm 0.3$  mm) but much smaller than those found for the autumn cohort ( $20.1 \pm 0.3$  mm) (see Jourdan-Pineau *et al.* (2010). There was a slight but significant difference in larval period ( $38.4 \pm 0.5$  days in autumn and  $32.8 \pm 0.3$  in spring,  $p<0.001$ , Fig. 3, Table 4 and Annex D). This difference is very small compared to the

difference in larval period in the field ( $77.6 \pm 1.5$  in spring and  $200 \pm 4.5$ ) because autumn tadpoles have to overwinter in the field (Jourdan-Pineau *et al.*, 2010). In both experiments larval period was shorter than larval periods in the field in spring (see Fig. 3 and Table 4). We found no effect of population on larval period but a significant effect on SVL (Table 4). Results remain identical if we add the two populations used for the autumn cohort only: there was no difference in SVL at metamorphosis but larval period was longer in autumn (SVL:  $15.44 \pm 0.1$  mm in autumn and  $15.38 \pm 0.2$  in spring,  $p=0.68$ ; larval period:  $38 \pm 0.3$  days in autumn and  $32.8 \pm 0.3$  in spring,  $p<0.001$ , Table 4 and Annex D). Besides, the population effect was significant on both larval period and SVL: it was similar to the cohort effect for larval period and greater than the cohort effect for SVL (Table 4).

## DISCUSSION

### Genetic characteristics of the samples

We found significant  $F_{IS}$  values for all loci at some sites. This may be caused by null alleles as this is probably the case for locus PPU17 showing high heterozygote deficiency in all samples. The occurrence of heterozygote deficiency in Parsley frog populations may arise as a few breeding pairs may produce the totality of a tadpole cohort in small ponds (personal observation and Jourdan-Pineau *et al.*, 2010). This is consistent with linkage disequilibrium observed in some sites, which may also be due to within-population structure in small sites. These two observations are further confirmed by AMOVA analyses, that indicated that most of the genetic variance ( $>90\%$ ) is within our samples.

### *Reduced gene flow between cohorts?*

The main pattern revealed by our study is a spatial genetic structure.  $F_{ST}$  values, FCA and AMOVA analyses showed that sites are genetically distinct units independently of time. Note

that at such a fine scale (the smallest distance was 6 km) genetic structure has already been observed in some amphibian species but is certainly not a general trend (e.g. Andersen *et al.*, 2004; Jehle *et al.*, 2005; Palo *et al.*, 2004; Rowe, Beebee, 2007; Zamudio, Wiczorek, 2007). However, as far as seasons are concerned, we found no differentiated gene pools corresponding to spring and autumn cohorts. Indeed, at the regional scale, there was no indication of two temporal populations. Even at the local scale, within sites, samples taken in two consecutive years at the same season (two spring cohorts or two autumn cohorts) were not more similar to each other than they were to the alternative season. We observed significant  $F_{ST}$  values within sites between seasonal cohorts but they were comparable to those found between samples of the same cohort and site in consecutive years. These  $F_{ST}$  values purely reflect sampling effects that are probably linked to the intra-sample structure and this would be in great agreement with  $F_{IS}$  values (see above).

We conclude that autumn and spring cohorts are not genetically differentiated at neutral markers.

#### *Adaptive differences between cohorts?*

Studying parsley frog, Joly *et al* have shown that, within a cohort, there was a canalization of size at metamorphosis despite change in temperature (Joly *et al.*, 2005). This suggests that a great difference in size between autumn and spring juveniles revealed by field measurements may well be due to genetic differences. Nonetheless, when reared in controlled conditions, spring and autumn tadpoles reached similar size at metamorphosis. The slight, non significant differences observed between cohorts are smaller than differences due to site effects within cohorts. Here we can clearly conclude that the large difference in size at metamorphosis of spring and autumn individuals was pure phenotypic plasticity. Therefore, the canalisation of size at metamorphosis described by Joly *et al* (2005) doesn't apply to overwintering tadpoles.

In many amphibian species, studies of larval traits have firmly established that the duration of the larval period is highly dependent upon temperature (for example, Berven, 1982; Newman, 1998; Smith-Gill, Berven, 1979) in such a way that even a small drop in temperature is expected to increase larval period. This is the most likely explanation for the small (5 days) difference we detected between lab-reared spring and autumn cohorts despite our effort to standardize rearing conditions. Indeed, the spring experiment was warmer by 0.4°C; when extrapolating by a linear fit the response of larval traits to temperature, such a slight thermal increase is expected to induce a decrease of this magnitude in larval periods (Joly *et al.*, 2005; Jourdan-Pineau *et al.*, 2010). Except for this consequence of our imperfect experimental settings, differences in larval periods observed in the field between autumn and spring cohorts (several months, Jourdan-Pineau *et al.*, 2010; Richter-Boix *et al.*, 2006) disappeared when both cohorts were raised in similar conditions.

On both larval traits, our results indicate that differences observed in the field between the two larval cohorts are based on phenotypic plasticity in contrasted environmental conditions.

## CONCLUSION

Neutral markers showed that there is no reduced gene flow between spring and autumn breeding cohorts, making genetic adaptation to distinct seasons highly unlikely. Accordingly, we found no evidence for genetic differences in larval traits in controlled-condition experiments. From those two complementary approaches, it seems obvious that the two breeding periods of Parsley frog are not the reflection of two temporal subpopulations. Consequently, *P. punctatus* is not likely to evolve into two temporal species by an allochronic sympatric speciation process. It rather appears that breeding in autumn or in spring are two alternative strategies for an adult parsley frog. We still have no idea whether one particular

adult can breed both in autumn and in spring each year which may constitute a diversified bet-hedging strategy (Philippi, Seger, 1989). Besides, as larvae laid in autumn and in spring have to develop in very contrasted environments, the two larval cohorts may end up yielding different fitness gains. It will be interesting to study the breeding strategies at the individual level and the larval fitness associated with each seasonal breeding to estimate the evolutionary potential of this breeding system.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by a grant from Agence Nationale de la Recherche (SCOBIM). Molecular data used in this work were (partly) produced through molecular genetic analysis technical facilities of the IFR119 « Montpellier Environnement Biodiversité ». Antoine Nicot and Virginie Dupuy helped us in molecular work. Experimental assistance was given by Joy Folly and particularly Jean-Marc Donnay.

## REFERENCES

- Andersen LW, Fog K, Damgaard C (2004) Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**, 1293-1302.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996) GENETIX 4.02 logiciel sous Windows<sup>TM</sup> pour la génétique des populations.
- Berven KA (1982) The genetic basis of altitudinal variation in the wood frog *Rana sylvatica* II. An experimental analysis of larval development. *Oecologia* **52**, 360-369.
- Bush GL (1975) Modes of Animal Speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **6**, 339-364.
- Charmantier A, McCleery RH, Cole LR, *et al.* (2008) Adaptive phenotypic plasticity in response to climate change in a wild bird population. *Science* **320**, 800-803.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* **1**, 47-50.
- Friesen VL, Smith AL, Gomez-Diaz E, *et al.* (2007) Sympatric speciation by allochrony in a seabird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 18589-18594.
- Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* **16**, 183-190.
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* **86**, 485-486.

- Gratani L, Crescente MF (1997) Phenology and leaf adaptive strategies of Mediterranean maquis plants. *ecologia mediterranea* **23**, 11-19.
- Guyétant R, Temmermans W, Avriillier JN (1999) Phenology of the reproduction of *Pelodytes punctatus* Daudin, 1802 (Amphibia, Anura). *Amphibia-Reptilia* **20**, 149-160.
- Hendry AP, Day T (2005) Population structure attributable to reproductive time: isolation by time and adaptation by time. *Molecular Ecology* **14**, 901-916.
- Jakob C, Poizat G, Veith M, Seitz A, Crivelli AJ (2003) Breeding phenology and larval distribution of amphibians in a Mediterranean pond network with unpredictable hydrology. *Hydrobiologia* **499**, 51-61.
- Jehle R, Burke T, Arntzen JW (2005) Delineating fine-scale genetic units in amphibians: Probing the primacy of ponds. *Conservation Genetics* **6**, 227-234.
- Joly P, Morand A, Plenet S, Grolet O (2005) Canalization of size at metamorphosis despite temperature and density variations in *Pelodytes punctatus*. *Herpetological Journal* **15**, 45-50.
- Jourdan-Pineau H, David P, Relyea RA, Crochet PA (2010) Autumn or spring spawning: impact of breeding phenology on larval fitness in Parsley frog, *Pelodytes punctatus*. *in prep.*
- Jourdan-Pineau H, Nicot A, Dupuy V, David P, Crochet PA (2009) Development of eight microsatellite markers in the parsley frog (*Pelodytes punctatus*). *Molecular Ecology Resources* **9**, 261-263.
- Kelly CA (1992) Spatial and Temporal Variation in Selection on Correlated Life-History Traits and Plant Size in *Chamaecrista-Fasciculata*. *Evolution* **46**, 1658-1673.
- Kirkpatrick M, Barton NH (1997) Evolution of a species' range. *American Naturalist* **150**, 1-23.
- Miller-Rushing AJ, Primack RB (2008) Global warming and flowering times in Thoreau's concord: A community perspective. *Ecology* **89**, 332-341.
- Miller AH (1962) Bimodal Occurrence of Breeding in an Equatorial Sparrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **48**, 396-&.
- Møller AP (2008) Climate change and micro-geographic variation in laying date. *Oecologia* **155**, 845-857.
- Newman RA (1998) Ecological constraints on amphibian metamorphosis: interactions of temperature and larval density with responses to changing food level. *Oecologia* **115**, 9-16.
- Palo JU, Schmeller DS, Laurila A, *et al.* (2004) High degree of population subdivision in a widespread amphibian. *Molecular Ecology* **13**, 2631-2644.
- Parmesan C (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **37**, 637-669.
- Philippi T, Seger J (1989) Hedging Ones Evolutionary Bets, Revisited. *Trends in Ecology & Evolution* **4**, 41-44.
- Pilar CD, Gabriel MM (1998) Phenological pattern of fifteen Mediterranean phanaerophytes from *Quercus ilex* communities of NE-Spain. *Plant Ecology* **139**, 103-112.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Przybylo R, Sheldon BC, Merilä J (2000) Climatic effects on breeding and morphology: evidence for phenotypic plasticity. *Journal of Animal Ecology* **69**, 395-403.
- R-Development-Core-Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. . In: *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.
- Ramstad KM, Foote CJ, Olsen JB (2003) Genetic and phenotypic evidence of reproductive isolation between seasonal runs of Sockeye salmon in Bear Lake, Alaska. *Transactions of the American Fisheries Society* **132**, 997-1013.

- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Richter-Boix A, Llorente GA, Montori A (2006) Breeding phenology of an amphibian community in a Mediterranean area. *Amphibia-Reptilia* **27**, 549-559.
- Rousset F (2008) GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.
- Rowe G, Beebee TJC (2007) Defining population boundaries: use of three Bayesian approaches with microsatellite data from British natterjack toads (*Bufo calamita*). *Mol Ecol* **16**, 785-796.
- Sinsch U (1992) Structure and Dynamic of a Natterjack Toad Metapopulation (*Bufo Calamita*). *Oecologia* **90**, 489-499.
- Smith-Gill SJ, Berven KA (1979) Predicting Amphibian Metamorphosis. *American Naturalist* **113**, 563-585.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex-100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for Pcr-Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques* **10**, 506-513.
- Walther GR, Post E, Convey P, *et al.* (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature* **416**, 389-395.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Yamamoto S, Sota T (2009) Incipient allochronic speciation by climatic disruption of the reproductive period. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **276**, 2711-2719.
- Zamudio KR, Wieczorek AM (2007) Fine-scale spatial genetic structure and dispersal among spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) breeding populations. *Mol Ecol* **16**, 257-274.

## FIGURE LEGENDS

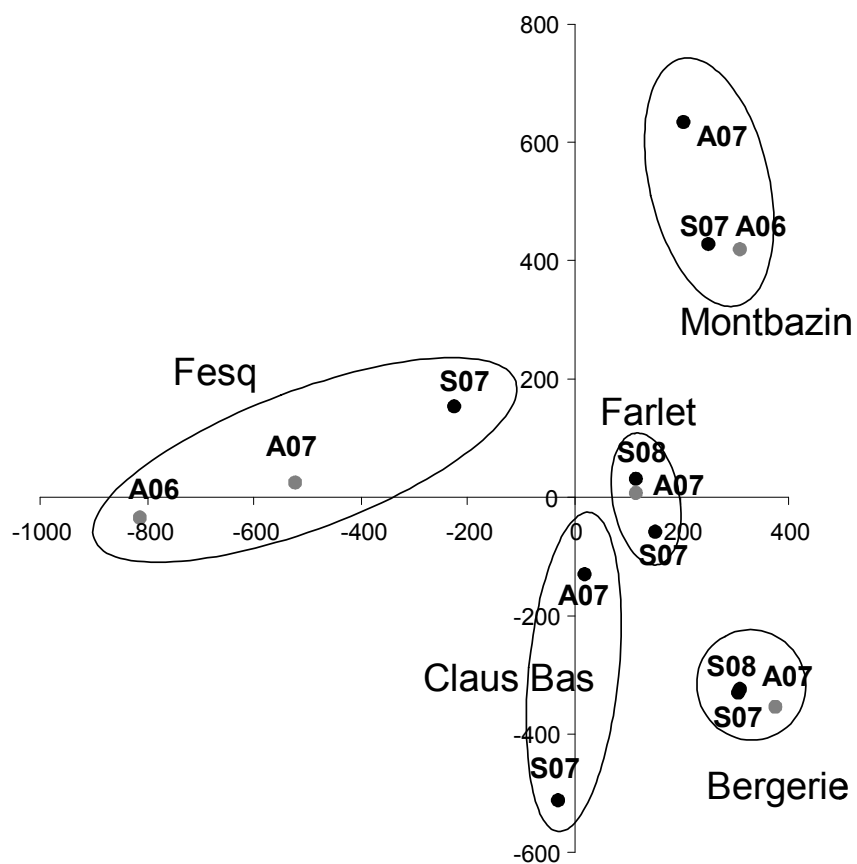
Figure 1: Graphical representation of the two major axes of the FCA analysis. S and A indicates seasonal provenance (Spring, black dots and Autumn, grey dots respectively). Samples from the same sites are grouped within an ellipse.

Figure 2: Assignment of individuals belonging to autumn (grey bars) and spring cohorts (black bars) to cluster 1 when STRUCTURE was set to K=2 clusters. Fe, B, M, F and C indicates the sites, Fesq, Bergerie, Montbazin, Farlet and Claus, respectively. There is no difference in assignment probability to one particular cluster between seasonal cohorts ( $p = 0.919$ ) but between sites ( $p < 0.0001$ ).

Figure 3: Larval period (days from hatching to forelimb protrusion, mean  $\pm$  SEM) and size at metamorphosis (snout-vent length, mm, mean  $\pm$  SEM) measured in experiments on autumn (grey bars) and spring (black bars) cohorts in 2009 (Farlet  $n = 23$  and  $30$  / Roubiac  $n = 31$  and  $49$ , in autumn and spring, respectively). Autumn and spring cohorts differed significantly in larval period ( $p < 0.001$ ) but not size at metamorphosis.



Fig. 1



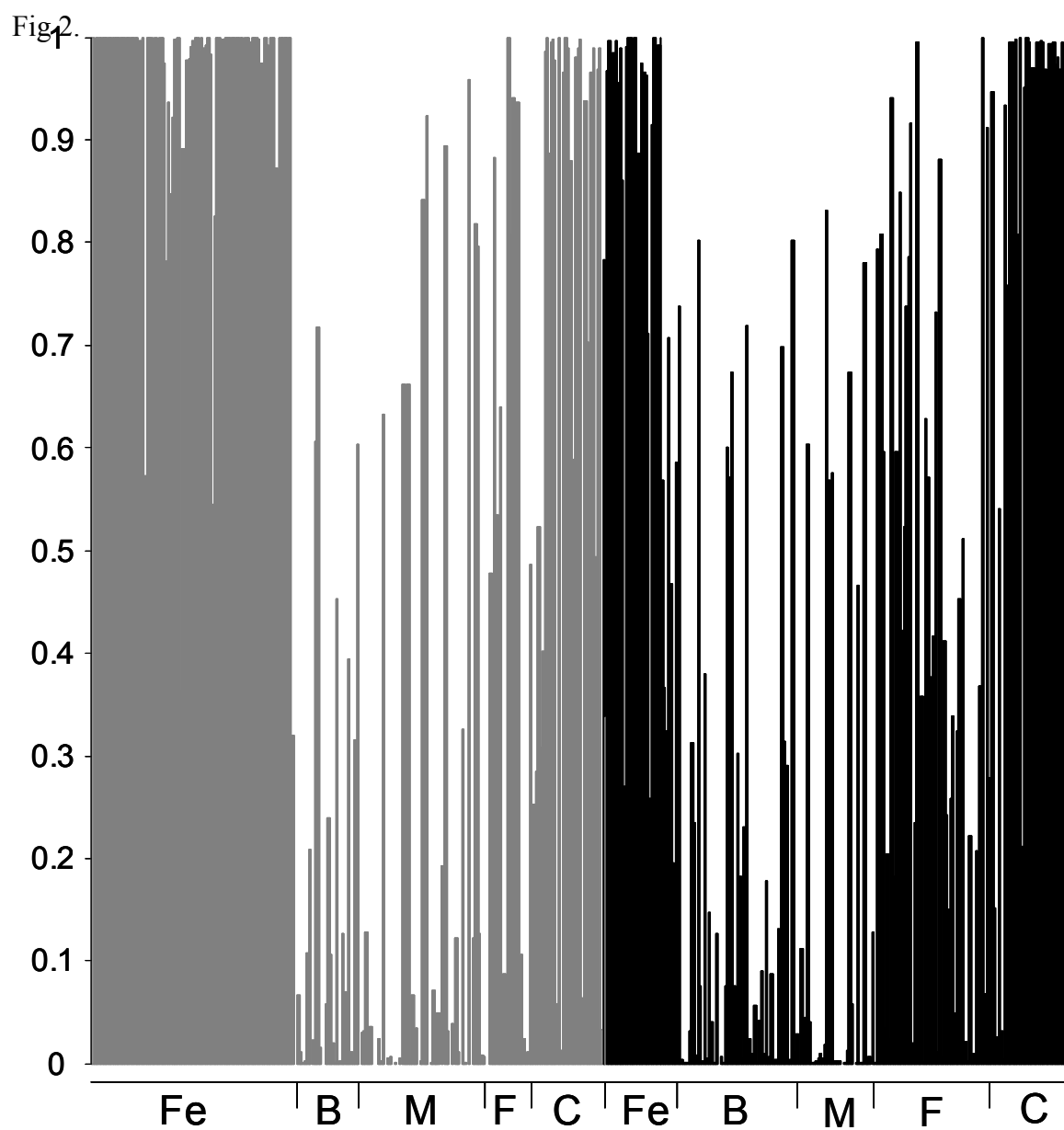


Fig3

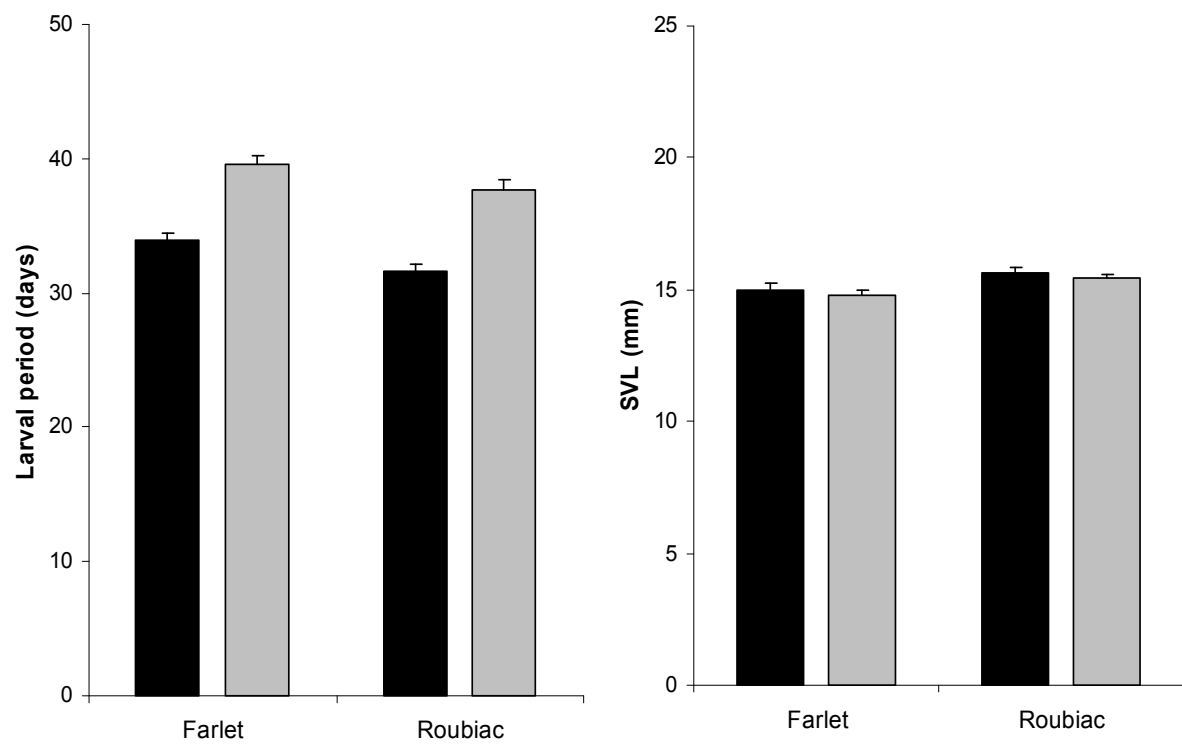


Table 1: Number of individuals (N), inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ , significantly different from 0 if bold letters) and allelic richness ( $A_R$ ) for each population and each temporal sample  
 $A_R$  are given for a reference sample size of 25.

Site	Season	N	$F_{IS}$	$A_R$
Montbazin	A06	30	<b>0.106</b>	4.580
	S07	32	0.043	4.444
	A07	32	<b>0.186</b>	3.707
bergerie	S07	32	0.021	4.587
	A07	32	<b>0.174</b>	4.384
	S08	31	0.044	4.720
Farlet	S07	32	<b>0.115</b>	5.240
	A07	25	-0.012	5.349
	S08	31	0.060	5.174
Fesq	A06	32	-0.018	4.785
	S07	32	0.014	3.187
	A07	63	<b>0.162</b>	4.852
Claus Bas	S07	30	<b>-0.102</b>	3.578
	A07	30	<b>0.174</b>	4.428

	Montbazin			Bergerie			Farlet			Fesq			Claus Bas		
	A06	S07	A08	S07	A07	S08	S07	A07	S08	A06	S07	A07	S07	A07	
A06	-	0.043	0.086	0.065	0.064	0.072	0.041	0.043	0.043	0.083	0.176	0.064	0.176	0.124	
S07	NS	-	0.144	0.122	0.119	0.132	0.066	0.068	0.051	0.098	0.145	0.076	0.145	0.079	
A07	*	*	-	0.162	0.161	0.146	0.119	0.098	0.099	0.17	0.274	0.111	0.274	0.156	
S07	*	*	*	-	0.019	0.018	0.016	0.025	0.05	0.099	0.186	0.085	0.186	0.154	
A07	*	*	*	*	-	0.002	0.044	0.044	0.068	0.114	0.156	0.086	0.156	0.157	
S08	*	*	*	*	NS	-	0.036	0.043	0.068	0.115	0.175	0.077	0.175	0.16	
S07	*	*	*	*	*	*	-	0	0.006	0.063	0.146	0.048	0.146	0.091	
A07	*	*	*	*	*	*	NS	-	0.002	0.064	0.134	0.038	0.134	0.094	
S08	*	*	*	*	*	*	NS	NS	-	0.057	0.124	0.04	0.124	0.074	
A06	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	0.151	0.028	0.151	0.132	
S07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.175	0.05	0.175	0.067	
A07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.104	-	0.104	0.078	
S07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	*	*	0.085	
A07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	

Table 2: Pairwise FST values between all samples (sites and seasons) (upper-right matrix) and their significance (lower-left Matrix, tested with 1000 permutations,  $\alpha=0.05$  - asterisks mark significant tests ; NS indicate non-significant population differentiation).

Table 3: Summary of the Molecular Analysis of Variance. Asterisks and NS mark significant ( $p < 0.05$ ) and non-significant effect, respectively. In the first model, samples are grouped primarily by their geographic origin whereas in the second model, all samples from the same season are grouped whatever the site they come from.

Source of variation	df	Sum of squares	% of variation
Among sites	4	125.342	5.15 *
Among samples within sites	9	80.395	4.43 *
Within samples within sites	914	1943.69	90.42 *
Among cohorts	1	10.382	-0.63 NS
Among sites within cohorts	12	195.355	9.27 *
Within sites within cohorts	927	1943.69	91.37 *

Table 4: Summary mixed model ANOVAS of larval period and size at metamorphosis (snout-vent length) measured in the lab experiments. Interactions between effects were tested and were all non significant.

Source	ndf	Age at metamorphosis			Size at metamorphosis (SVL)	
		Sum of Square	F ratio		Sum of Square	F ratio
<i>Spring 2009 (20°C )</i>						
Block	3	89.72	5.61	**	10.61	2.67
Population	1	68.44	5.83	*	5.05	4.08
Family (population)	10	133.24	2.50	*	12.18	0.92
<i>Autumn 2009 (20°C )</i>						
Block	2	467.47	21.88	***	10.63	5.57 **
Population	3	188.09	1.82		22.18	5.02 *
Family (population)	16	591.94	3.46	***	24.47	1.60
<i>20°C, Farlet and Roubiac</i>						
Cohort	1	1041.35	42.5759	***	1.81683	1.4214
Block (cohorte)	5	382.078	7.0143	***	16.1989	2.7746 **
Population	1	85.9287	3.823		16.1001	12.7573 ***
Family (population)	19	485.361	2.3448	**	24.4536	1.1022
<i>20°C, all populations</i>						
Cohort	1	1697.87	191.6239	***	0.173	0.1688
Block (cohorte)	5	868.35	19.6007	***	25.092	4.8911 **
Population	3	428.21	16.1094	***	24.513	7.9637 ***
Family (population, cohort)	27	874.34	3.6548	***	37.708	1.3612

## ANNEXES

Annex A: Use (G for genotyping and E for experimental rearing), sampling date (season, S for Spring and A for Autumn and year), geographical localization for each site studied. Sampling dates for experimental rearing are bold letters.

Pond Name	Use	Sampling date	Latitude	Longitude
Bergerie	G	S 07 + A 07 + S 08	43.5803	3.7019
Boissière	<b>E</b>	<b>A 09</b>	43.8337	3.7461
Claus bas	G	S 07 + A 08	43.8256	3.8761
Farlet	G & <b>E</b>	S 07 + A 07 + S 08 + <b>S 09 + A 09</b>	43.4908	3.7415
Fesq	G	A 06 + D 07 + A 07	43.8028	3.7919
Montbazin	G	A 06 + D 07 + A 07	43.5308	3.6675
Roubiac	<b>E</b>	<b>S 09 + A 09</b>	43.7597	3.7879
Sueuilles	<b>E</b>	<b>A 09</b>	43.7597	3.7772

Annex B: Inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ , significantly different from 0 if bold letters) at genotyped loci for each sample. For some samples, PPU6 was monomorphs, hence there is no  $F_{IS}$  value.

Site	Season	all	PPU2	PPU5	PPU6	PPU10	PPU11	PPU15	PPU16	PPU17
Montbazin	A06	<b>0.106</b>	0.006	<b>-0.194</b>		-0.151	<b>0.644</b>	0.275	-0.089	<b>0.486</b>
	S07	0.043	-0.118	<b>-0.343</b>		-0.088	0.277	0.295	-0.123	<b>0.631</b>
	A07	<b>0.186</b>	0.151	0.05		<b>0.168</b>	<b>0.481</b>	-0.182	<b>0.146</b>	<b>0.494</b>
bergerie	S07	0.021	-0.088	-0.05		-0.034	-0.116	0.04	-0.041	<b>0.431</b>
	A07	<b>0.174</b>	-0.025	-0.122	0	<b>0.289</b>	<b>0.404</b>	-0.24	<b>0.163</b>	<b>0.602</b>
	S08	0.044	<b>0.243</b>	-0.116	0	-0.04	0.094	-0.076	-0.124	<b>0.315</b>
Farlet	S07	<b>0.115</b>	-0.093	-0.094	0	0.139	0.2	0.24	-0.046	<b>0.597</b>
	A07	-0.012	-0.017	-0.243	<b>-0.011</b>	-0.096	-0.139	0.026	0.027	<b>0.268</b>
	S08	0.06	-0.012	-0.067	<b>0.487</b>	-0.001	0.049	-0.046	-0.054	<b>0.438</b>
Fesq	A06	-0.018	0.04	-0.077	0.096	-0.168	0.077	0.135	-0.07	-0.024
	S07	0.014	-0.144	-0.185	-0.069	<b>0.488</b>	-0.331	-0.133	-0.045	<b>0.307</b>
	A07	<b>0.162</b>	<b>0.137</b>	0.001	<b>0.629</b>	0.094	<b>0.338</b>	<b>0.276</b>	0.004	0.084
Claus Bas	S07	<b>-0.102</b>	<b>-0.273</b>	-0.185		-0.251	0.198	-0.143	0.061	0.02
	A07	<b>0.174</b>	-0.02	0.114		-0.183	<b>0.614</b>	-0.146	<b>0.328</b>	<b>0.431</b>



Annex C: linkage disequilibrium (p-values) between loci in Montbazin tadpoles sampled in autumn 2007, PPU6 is not represented here since it was monomorph in this sample.

loci	PPU5	PPU10	PPU11	PPU15	PPU16	PPU17
PPU2	0.27538	0.01261	0.00126	0.00197	0.07402	0.00983
PPU5		0	0.00635	0	0	0.00101
PPU10			0.00008	0	0.00068	0.00426
PPU11				0	0.00064	0.00199
PPU15					0.00054	0.00004
PPU16						0

Annex D: N (number of individuals measured for both traits), mean and SEM of SVL and larval period measured on tadpoles reared in the laboratory for each site and each cohort

Population	N		SVL				Larval period			
	P09	A09	P09		A09		P09		A09	
Boissière		21			15.76	0.21			39.48	1.01
Farlet	23	30	15.04	0.25	14.79	0.21	34.96	0.65	39.73	0.80
Roubiac	31	49	15.64	0.22	15.42	0.15	31.35	0.54	37.53	0.70
Sueuilles		52			15.71	0.14			36.54	0.39



## Chapitre 5

---

# Impact de la phénologie de reproduction sur le développement larvaire

Dans le chapitre 3, nous avons vu que les pics de reproduction prennent place en octobre et en février. La description des caractéristiques des mares en automne et au printemps montre que les milieux ne sont pas identiques, même si l'on n'a pas trouvé d'impact des paramètres étudiés sur la survie différentielle des deux cohortes. Ainsi, avoir des parents qui se reproduisent en automne ou au printemps implique des conditions de développement très différentes pour les têtards. Ce point de vue est tout à fait valable dans le contexte des changements climatiques : on observe des changements de phénologie chez de nombreuses espèces et l'impact de ces changements sur la *fitness* des descendants est rarement connu [Crick et al., 1997; Beebee, 2002]. Pourtant, cette donnée est certainement cruciale pour connaître la résilience des populations aux changements climatiques.

Dans le cas précis du Pélodyte, les deux saisons de reproduction existent et ne sont pas une réponse aux changements climatiques récents mais plutôt un reflet des contraintes climatiques rencontrées par le Pélodyte au cours de son histoire évolutive (lors de la mise en place de sa distribution actuelle au dernier recul post-glaciaire). De plus, ce cas extrême de variation phénologique peut permettre de révéler des patrons potentiels de réponse des populations aux changements climatiques via des modifications de date de reproduction. Ainsi, nous avons étudié les trajectoires de développement des têtards d'automne et de printemps observés sur le terrain. Ceci indique très clairement que les uns et les autres connaissent un début de développement (principalement caractérisé par de la croissance et peu de différenciation) rapide pendant que les températures sont clémentes. Cependant, alors que les têtards d'automne vont vite connaître un ralentissement de la croissance et un arrêt total de leur différenciation, les têtards de printemps continuent de se développer et s'engagent dans la métamorphose. Ils deviennent des juvéniles émergeant des mares en 2 à 3 mois. Les têtards d'automne reprennent leur développement à la sortie de l'hiver et terminent leur vie larvaire environ 7 mois après leur éclosion. Au final, les individus pondus en automne se métamorphosent un mois plus tôt que ceux

de printemps. De façon très intéressante, ces trajectoires différentes en terme de rythme de développement produisent également des différences de taille à la métamorphose : les juvéniles d'automne sont plus grands que ceux de printemps (2 cm contre 1,5 cm environ).

C'est principalement cette différence de taille que nous avons cherché à comprendre en laboratoire. Notre hypothèse était qu'un développement plus lent, à des températures plus basses devait induire une taille à la métamorphose plus élevée (ainsi que d'autres auteurs l'observaient chez plusieurs espèces d'anoures). Pourtant, en comparant les développements de têtards élevés à 18°C et à 20°C, nous avons observé le phénomène inverse : les temps de développement plus longs (effectivement observés à 18°C) produisaient des juvéniles plus petits. Une dernière expérience, de transfert séquentiel de têtards, nous a permis de proposer des explications pour concilier l'ensemble des résultats précédents. Des têtards (issus du même épisode de reproduction sur un unique site) ont été amenés au laboratoire et élevés en conditions contrôlées à 20°C après avoir passé de quelques jours à six mois sur le terrain. Ainsi les têtards ayant passé l'hiver (décembre) sur le terrain, finissent par se métamorphoser à une taille supérieure à ceux qui ont passé tout leur développement à 20°C. Ceci indique que des très basses températures sont nécessaires pour conférer un gain de croissance à des têtards de *Pélodyte*. La croissance et la différenciation cessent en deçà d'une certaine température seuil. Nous faisons l'hypothèse (en nous appuyant sur des données de littérature) que ces seuils sont différents et que la croissance peut se poursuivre alors que la différenciation a cessé.

Cette étude montre que la reproduction d'automne est une stratégie parfaitement efficace pour les *Pélodytes* puisqu'elle permet de produire des juvéniles plus grands. Il est probable que ceci ait une influence sur la *fitness* future de ces individus. En Méditerranée occidentale, les simulations proposent un réchauffement global des températures à toutes les saisons et une augmentation de la pluviométrie en hiver associée à une baisse de la pluviométrie aux autres saisons (Gibelin, Dequé, climate dynamics 2003). Lors de tels changements climatiques, les espèces montrant une grande plasticité phénotypique larvaire, comme le *Pélodyte*, risquent de s'adapter fort bien en modifiant leur phénologie sans mettre en jeu leur survie larvaire. Cependant, on peut attendre beaucoup de modifications à l'échelle des communautés et il est difficile de prédire vraiment le devenir des communautés d'amphibiens.

**Autumn or spring spawning:  
impact of breeding phenology on larval fitness in Parsley frog, *Pelodytes punctatus***

HELENE JOURDAN-PINEAU<sup>1</sup>, PIERRE-ANDRE CROCHET<sup>1</sup>,  
RICK RELYEA<sup>2</sup> and PATRICE DAVID<sup>1</sup>

**Submitted to Journal of Animal Ecology**

<sup>1</sup>Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5175 CNRS, 1919 route de Mende,  
34293 Montpellier cedex 5, France

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, University of Pittsburgh, 101 Clapp Hall, Pittsburgh, PA  
15260, USA

*Received:*

*Keywords:* breeding phenology, fitness, larval development, metamorphosis, life history traits,  
amphibian

*Correspondence:* Hélène Jourdan-Pineau, CEFE, UMR 5175 CNRS, 1919 route de Mende,  
34293 Montpellier cedex 5, France; Fax: (+33) 4 67 41 21 38; Email:  
helene.jourdan@cefe.cnrs.fr

## ABSTRACT

Climate change modifies the distribution and phenology of many species throughout the world. Poikilotherm animals are particularly exposed as their whole development is highly temperature-dependent. In such species, changes in breeding phenology may place offspring in unusual environmental conditions since the very beginning of their life, with potentially profound consequences on rates of growth and development, and ultimately on their fitness. Species where breeding phenology is naturally variable constitute valuable models for understanding these consequences and ultimately predicting the effect of climate change on poikilotherm organisms. We examine here the developmental consequences of extreme naturally occurring variation in breeding phenology in the parsley frog (*Pelodytes punctatus*). The species exhibits a bimodal breeding strategy in Mediterranean regions: larvae from autumn breeding events overwinter and metamorphose in the spring whereas larvae from spring breeding events metamorphose in the early summer. Survival was similar for the two cohorts in field situations. However, autumn tadpoles metamorphose at a larger size than spring tadpoles. Field data and laboratory experiments revealed that, although a moderate decrease in temperature tends to decrease size at metamorphosis, a change in the developmental trajectory occurs in winter, at very low temperatures, so that overwintering tadpoles undergo a supplement of growth before they engage in metamorphosis during the following spring. Because larger size at metamorphosis enhances subsequent survival and fecundity, breeding in autumn seems currently advantageous for the Parsley frog. Climate change (e.g. milder winters) may alter the developmental trajectory of autumn tadpoles and affect the relative benefits of autumn versus spring breeding.

## INTRODUCTION

Mean global temperatures have increased during the last decades, affecting many organisms worldwide (Parmesan, 2006, Walther et al., 2002). Some species tend to track their climatic niche by shifting their range towards the poles or towards higher altitudes (e.g., Perry *et al.*, 2005 for fishes). However, the most frequently observed impacts of global warming are changes in species phenology. For example, many plants now flower earlier than they did a century ago (Miller-Rushing and Primack, 2008) and many bird species advanced their egg-laying date to match the earlier peak of their food supply (Both et al., 2004, Crick et al., 1997, Møller, 2008). Understanding how changes in phenology can affect individual survival, growth and development is crucial to evaluate the fate of organisms subjected to climate change.

Amphibians, the class of vertebrates with the highest proportion of threatened species (Stuart *et al.*, 2004), may be particularly vulnerable to climate change. Because many species live in small, freshwater habitats with hydroperiods and water temperatures that are influenced by air temperatures (Beebee and Griffiths, 2005, Carey and Alexander, 2003), amphibian development is largely dependent on temperature, especially in temperate regions. The potential impacts of climate change on amphibians breeding phenology have been studied in many species and yielded mixed results: some species breed earlier with warmer temperatures whereas others show no response (Beebee, 1995, Beebee, 2002, Blaustein et al., 2001, Carey and Alexander, 2003, Gibbs and Breisch, 2001, Reading, 2003). Beebee (2002) suggested that protracted (i.e. prolonged) breeders would be more likely to respond to changing temperatures with earlier onset of reproduction than explosive breeders.

For amphibian species that do alter their breeding phenology with temperature, both inter-annual variation in temperature and global warming will affect the temporal window available for larval development (Wilbur, 1980) with potentially important effects on the

fitness of larvae and the viability of populations (Carey and Alexander, 2003). For example, offspring born at different times can experience different temperature regimes, hydroperiods, primary productivity, competitors, and predators (Diaz-Paniagua, 1988, Jakob et al., 2003, Richter-Boix et al., 2006). Such conditions will cause different developmental trajectories that produce differences in time to and size at metamorphosis (e.g. Audo et al., 1995, Blouin and Brown, 2000, Merila et al., 2000, Relyea, 2007, Richter-Boix et al., 2004). Ultimately, these differences can affect adult survival and reproduction (Altwegg and Reyer, 2003, Smith, 1987).

Species showing temporal variability in reproduction are good models to study the effects of altered phenology on larval development. Yet this approach has only been taken in a few studies. For example, Reading and colleagues showed that spawning date of *Bufo bufo* varied continuously within a temporal window of 50 days in response to temperature (Reading, 2003, Reading and Clarke, 1999). Moreover, earlier spawning induced shorter tadpole stage duration and earlier emergence but didn't influence tadpole mortality. However, size at metamorphosis was not measured in this study. On the contrary, *Hyla andersonii* showed two separated (by about one month) breeding events and late tadpoles had lower survival, slower development and smaller size at metamorphosis than early tadpoles (Morin *et al.*, 1990). However, because Morin *et al.* (1990) measured larval traits in semi-natural mesocosms, it remains unclear if their results would also apply to field conditions.

To understand how differences in breeding phenology affect the survival, growth, and development of amphibians, we studied Mediterranean populations of the parsley frog (*Pelodytes punctatus*). The Mediterranean climate is characterized by hot summers, mild winters and two rainy periods in autumn and in spring. While most anuran species of these regions are spring or summer-breeders (Jakob *et al.*, 2003), Mediterranean populations of the parsley frog take advantage of the features of Mediterranean climate by breeding in spring



and in autumn (Guyétant *et al.*, 1999, Jakob *et al.*, 2003, Richter-Boix *et al.*, 2006). This extreme, bimodal variation in breeding date produces two larval cohorts that are exposed to very different conditions: autumn-hatched larvae have to overwinter and metamorphose in the spring (Guyétant *et al.*, 1999). In contrast, spring-hatched larvae metamorphose after only approximately 2 months (Geniez and Cheylan in prep).

In a previous study, we used microsatellite markers and common garden experiments to assess genetic differences between the autumn and spring larval cohorts (Jourdan-Pineau *et al.*, 2010). Both approaches found no genetic differences between autumn and spring-hatched larvae in either the neutral markers or life-history traits. We can thus be confident that differences in development between autumn and spring larvae result from environmentally induced changes.

In this study, we investigated the fitness consequences of developing in the different environments experienced by spring and autumn larval cohorts. Using field observations, we quantified survival, time to metamorphosis, and size at metamorphosis of autumn and spring cohorts. Using temperature manipulation and partial transfer experiment in lab conditions, we studied the mechanisms that generate the phenotypic differences between autumn and spring cohorts that were observed in the field.

## MATERIAL AND METHODS

### Field survey

The field study was carried out from September 2007 to August 2009 to include two autumn and two spring breeding events. We examined breeding events in 19 ponds that were located in four areas near Montpellier (southern France): Gardiole (five ponds), Cournonterral (five ponds), Cazevieille (four ponds), Notre-Dame de Londres (five ponds; see Appendix A). The Gardiole and Cournonterral sites are small calcareous hills with Mediterranean matorral habitats whereas the Cazevieille and Notre-Dame de Londres areas are a mixture of clay depressions with pasture and small calcareous ridges covered with low scrubs.

Each pond was surveyed twice each month. The parsley frog's embryonic period ranges from 5 days at 15°C to 15 days at 10°C (Toxopeus *et al.*, 1993). Thus, our survey interval of 15 days may have lead us to miss some breeding events but prevented us from double counting clutches during two successive visits since old clutches can be distinguished from newer clutches based on the developmental stages of the embryos. From our whole dataset, in 2% of the larval cohort produced, small larvae are observed whereas we didn't notice the presence of egg mass before.

During each visit, we looked for newly deposited egg masses throughout the entire water body. The egg mass detection, even if not perfect, was similar in autumn and in spring. Since breeding activity is linked to rainfall in the parsley frog (Diaz-Paniagua, 1988, Guyétant *et al.*, 1999, Jakob *et al.*, 2003, Richter-Boix *et al.*, 2006), the spawning date was approximated by considering the rainfall period before the observation of clutches. More precisely, we used the day after the peak of precipitations as an approximation of spawning date and checked the validity of this date using the stage of embryonic development on the day of observation. This estimation appeared to be correct except for 2 spawning events over 30 when there was no rainfall before spawning. In the remaining two cases, we use the

embryonic development of eggs observed in conjunction with the water temperature to estimate the spawning date.

Based on egg mass counts, we could estimate the number of eggs laid in each pond. Egg mass were classified as small, medium and large and this corresponded to an average of 75, 150 and 250 eggs per mass, respectively (Salvador and Paris, 2001 and personal observation).

To assess the survival and growth of tadpoles in the ponds over time, we used a standardized dipnetting protocol. In each pond, we sampled using five to 10 dip-net hauls (depending on the pond size). Tadpoles that were collected in the dip nets were counted and their size was estimated (see below). Tadpoles were then released back to their pond of origin. The number of tadpoles in a pond was estimated using the mean number of tadpoles caught per dip-net haul. This measure of “tadpole density” (per dip-net) was then scaled to a sampling surface of 1 m<sup>2</sup> (one dip-net haul sampled a surface of 0.5 m<sup>2</sup>, taking the dip-net size and the length of the haul into account). Finally, the number of tadpoles per square meter was multiplied by the surface of the pond. Because autumn breeding events produce tadpoles that overwinter and overlap temporally with tadpoles produced by spring breeding events, it was sometimes impossible to know with certainty if tadpoles sampled in spring belonged to the autumn or to the spring cohort. In such cases, measurements (see below) were discarded.

Ideally, the proportion of animals surviving to metamorphosis is derived from the number of metamorphs emerging from the pond divided by the total number of eggs produced. However metamorphs cannot be counted directly because they leave the sites as soon as metamorphosis is complete. As a result, the number of metamorphs was estimated as the mean number of tadpoles counted in the last three visits before we observed any metamorph in the pond (making the realistic assumption that survival to metamorphosis is very high at this time). It was sometimes impossible to follow the larval development and

metamorphosis of offspring from a particular spawning event. Indeed, parsley frogs may lay eggs three to four times during each seasonal breeding event. In these cases, the successive sub-cohorts produced are undistinguishable after a few weeks, and we added the egg counted in two or three successive visits to evaluate survival from a combination of breeding events within a given season.

Larval period was measured as the time elapsed from egg hatching to the date at which approximately 50% of the cohort reached metamorphosis (Gosner stage 42, corresponding to forelimb protrusion, Gosner, 1960). The hatching date was considered as the spawning date (range: 7 September to 14 November in autumn and 18 January to 27 April in spring) plus 10 days, equivalent to the mean embryonic period of the parsley frog (*Toxopeus et al.*, 1993). This estimate of larval period is quite rough since the delay between two visits was 15 days. Again, when tracking a cohort from spawning to metamorphosis was impossible, data from that breeding event were discarded.

Tadpole size (measured as snout-vent length; SVL) was estimated in the field by assigning each tadpole to a 3-mm wide class (e.g., 3 to 6 mm, 6 to 9 mm, etc) using a gauge. To estimate growth (i.e. the change in SVL over time), each individual was attributed the mid-value of its class range as SVL (e.g. individuals belonging to the 3 to 6 mm size class were assigned a value of 4.5mm). Larval growth curves were based on class-SVL with a total of about 11,600 points (potentially including several measures at different dates for the same individual). During the second year of the survey, in addition to visual estimates, tadpole SVL was measured precisely with a calliper once they reached Gosner stage 26 (first stage showing hind limb buds) and until Gosner stage 46 (the end of metamorphosis, true juvenile). These data were used to estimate the mean SVL of given larval stages. Assessing larval growth based on SVL can be complicated by the fact that tadpoles engaged in metamorphosis can experience a decrease in SVL. Moreover, as the population metamorphoses, the slower

developing tadpoles stay in the ponds and therefore bias the sample of SVL in the pond over time. To deal with these issues, as we did in the case of larval period, we only collected data from a cohort until 50% of the cohort reached Gosner stage 42.

To quantify larval development, Gosner stages were grouped into 5 categories: Gosner stages 25 to 29 (from free swimming tadpole with independent feeding to tadpole with developed limb buds), 30 to 36 (toe development), 37 to 39 (developed toes showing metatarsal and subarticular tubercles), 40 (totally developed hind limbs), 41 (forelimbs visible under skin) and 42.

### **Temperature manipulation experiment**

Our field observations showed differences in larval development between autumn and spring tadpoles (see results). Since we previously demonstrated that autumn and spring cohorts are not genetically distinct, neither for neutral markers nor for quantitative traits of larval development (Jourdan-Pineau *et al.*, 2010), we hypothesized that the differences in developmental trajectory between autumn and spring tadpoles may be linked to characteristics of the natural environment, with the most obvious candidate being the colder temperatures experienced by the autumns cohort. To measure how larval phenotypic differences are affected by temperature differences, we collected eggs from various ponds, hatched the tadpoles, and then reared the tadpoles in the lab at two temperatures through metamorphosis.

The temperature manipulation experiments were performed in spring 2008, spring 2009 and autumn 2009. In spring 2008, we collected eggs from six ponds and raised the hatched tadpoles at  $17.8^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  (mean  $\pm$  SEM). For technical reasons, it was not possible to maintain colder temperature even though it would have been interesting for scientific purpose. The six ponds were Pataris, Courtpatassière, Seuilles, Boissière, Peyre Cane and Claus Bas (see Appendix A). The ponds at Courtpatassière and Peyre Cane were not part of

the pond surveyed but were chosen because spawning events were synchronized with the other ponds. In spring 2009 and autumn 2009, we collected eggs from four ponds and raised the hatchlings at  $20.3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2$  and  $20.0 \pm 0.2$ , respectively (mean  $\pm$  SEM). The four ponds were Roubiac and Farlet (spring 2009 and autumn 2009), Seuilles and Boissière (autumn 2009). Thus Seuilles and Boissiere were used in the two thermal conditions to allow clear comparisons. We could not include more ponds in the two treatments because only these two ponds harboured both spring and autumn cohorts during the time windows chosen for egg collection. In all experiments, 6 egg masses were collected from each pond and brought to the lab where they were allowed to hatch in our amphibian rearing facilities (Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, Montpellier). After the embryos hatched, 10 tadpoles per clutch were reared until metamorphosis.

Experimental units consisted of 4 plastic tanks (surface:  $1\text{m}^2$ , depth: 10cm) filled with water from an underground well. To prevent tank effects, we circulated the water among tanks. Individual boxes (1-L plastic boxes with plastic mesh at the bottom (mesh size roughly 1 mm) were placed in those big tanks so that tadpoles shared the same water. Tadpoles were fed *ad libitum* with rabbit chow (Lapina Finish; DP Nutrition, Vannes, France). Water was changed every 2 weeks to avoid fouling. Water temperature was measured in the tanks almost every day. Photoperiod was set at a schedule of 12 hrs of light and 12 hrs of dark.

Larval growth was assessed for the first experiment in spring 2008 through regular measurements of tadpole SVL. Every 10 d, tadpoles were photographed and the images were analysed using the software ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004). In spring 2009 and autumn 2009, the animals were only measured at Gosner stage 46.

When the animals metamorphosed, we measured larval period and SVL (Appendix B). Larval period was defined as the time elapsed from hatching until forelimb protrusion at Gosner stage 42. Tanks were checked daily and all metamorphs were collected and kept in their boxes

with 5mm of water until complete tail resorption (Gosner stage 46). At this stage, we measured SVL to the nearest 0.5 mm with a calliper.

### **Sequential transfer experiment**

Given the differences in growth observed in the field between autumn and spring cohorts (see results), we wondered how the developmental trajectory of autumn tadpoles is modified during overwintering in such a way that they end up being larger at metamorphosis than spring tadpoles. We did a sequential transfer experiment in which we captured tadpoles in the field at different points in their development after an increasing amount of time spent in their natal pond and transferred them into a 20 °C lab environment until metamorphosis.

This sequential transfer experiment was performed only on the Roubiac population. We collected 20 to 40 individuals, originating from the same breeding event from October 2009 to April 2010 (sampling dates: 14 October (eggs), 12 November, 11 December, 07 January, 11 February, 17 March, and 19 April). The first collection consisted of eggs and was part of the temperature manipulation experiment; subsequent collections were tadpoles. We used the same experimental setup as the temperature manipulation experiments and all individuals were reared to metamorphosis. Temperature was maintained at 20°C and did not significantly differ between months: October =  $20.0 \text{ °C} \pm 0.2 \text{ °C}$ ; November =  $19.4 \pm 0.3$ ; December =  $19.9 \pm 0.4$ ; January =  $20.1 \pm 0.1$ ; February =  $20.2 \pm 0.1$ ; March =  $19.9 \pm 0.3$ ; and April =  $20.6 \pm 0.4$  (mean  $\pm$  SEM).

As in the temperature manipulation experiment, larval period and SVL at metamorphosis were measured for each individual.

### **Statistical analyses**

All statistical analyses were performed with R (R-Development-Core-Team, 2008) and Jump 7.0 (SAS Institute Inc.). The field survival (as a ratio of juveniles produced over the number of eggs laid) was transformed ( $\text{Arcsin}(\sqrt{\text{survival}})$ ) to obtain data normality. Then a one way ANOVA was used to assess if survival differed between seasons. The effect of stage, season and site on SVL (precise measurements) was analysed by a linear model. A one-way ANOVA was used to assess the effect of season on larval period (one measure for each successful breeding event). The analyses of lab data (larval period and size at metamorphosis) required the use of linear mixed model using site and family as random effects. Larval period was not normally distributed so we conducted a  $\log(\text{larval period}-20)$  transformation. This data transformation did not change the results of analyses, so we report the untransformed values of larval period (see Appendix B). Analysis of correlations between SVL and larval period were performed with a multivariate analysis of variance (MANOVA with Jump7.0). The aim was to test whether the two traits covaried in the same way between autumn and spring cohorts, and within cohorts, or, alternatively, whether the associations of traits typical of the spring and autumn cohorts were of a different nature and could not be extrapolated from patterns of within-cohort variation.



## RESULTS

### Field survey

Tadpole survival from spawning to complete metamorphosis differed between years and among sites ( $p < 0.01$  for both effects) but there was no significant difference in survival between the spring and autumn cohorts ( $p = 0.75$ , Fig. 1). Therefore, autumn and spring breeding events were similarly successful at producing metamorphs.

Size and time at metamorphosis also differed among cohorts. Tadpoles from autumn cohorts had a 2.5-fold longer larval period than spring tadpoles (Fig. 2A,  $p < 0.001$ ) but because of their earlier spawning time, the autumn cohorts still metamorphosed one month earlier than spring cohorts (07 May for autumn tadpoles and 05 June for spring tadpoles). Size at Gosner stage 42 varied significantly between cohorts (Fig. 2B,  $p < 0.001$ ) with autumn cohorts having a 30% larger SVL than spring cohorts.

To further explore the larval growth of each cohort, we assessed tadpole growth based on field measurements from Gosner stage 25 to 35 (during hind limb toe development). Water temperatures were not different during the first 30 d after hatching in autumn and spring ( $15.1 \pm 0.3^\circ\text{C}$  in autumn and  $15.2 \pm 1.1^\circ\text{C}$  in spring,  $p = 0.70$ ; Fig. 3). After the first 30 d, however, water temperature increased to  $25^\circ\text{C}$  for the spring cohorts whereas it decreased to  $5^\circ\text{C}$  for the autumn cohorts (Fig. 3).

In agreement with the temperature changes, we found no difference between autumn and spring tadpole growth curves until the tadpoles were 35 d old (Fig. 3). After 35 d, the growth of autumn tadpoles slowed down and eventually ceased during the winter until autumn cohorts began to grow again in spring.

Differentiation curves differed mainly in the onset of differentiation beyond Gosner stage 25 to the next stages. In the autumn cohorts, development was delayed to the end of winter and

nearly 5 months after hatching (Fig. 4). Noticeably, once the limb buds appeared in a cohort, the slopes of differentiation curves were not different ( $p=0.06$ ).

We also examined the rate of development in the field. From Gosner stage 26 to 44, there were significant differences in SVL between cohorts for three of the four Gosner categories ( $p<0.05$  except for Gosner stage 39 to 41, Fig. 5). Finally, for both seasonal cohorts, SVL decreased at the end of metamorphosis but the difference between autumn and spring SVL persisted.

In summary, field survey revealed that tadpoles from autumn and spring cohorts had similar survival rate to metamorphosis. The main differences between autumn and spring cohorts were the duration of the larval periods and the size at metamorphosis. Although spring cohorts developed faster than autumn cohorts, autumn cohorts grew larger before they engaged in metamorphosis and hence metamorphosed both earlier (in the season) and at a larger size than the spring cohorts.

## **Temperature manipulation experiment**

### *Effect of temperature on larval period and SVL*

Two of the six populations reared at 18 or 20°C, (Seuilles and Boissière) had both spring and autumn cohorts that allowed a direct comparison of the effects of temperature on each seasonal cohort. The colder temperature caused an increase in larval period for both populations by more than 20 d ( $p<0.001$ , Fig. 6A) and a decrease in size at metamorphosis ( $p<0.001$ , Fig. 6B). Using all populations reared at 18°C in spring 2008 and at 20°C in spring 2009 and autumn 2009, the results were the same (Appendix B). The colder temperature consistently caused an increase in larval period and a decrease in SVL at metamorphosis ( $p<0.001$  for both measures, Table 1).

### *Correlations between traits, decomposition of variance and covariance*

When considering all experiment together, we found a negative correlation between SVL and larval period ( $R=-0.3067$ ,  $p<0.001$ ). This simply reflects the fact that colder environments induce both slower development and slower growth. Within each temperature, we still observed a negative correlation at 18°C ( $R= -0.4038$ ,  $p<0.001$ , Fig. 7.A) and at 20°C ( $R= -0.1305$ ,  $p=0.026$ , Fig. 7.B). At 20°C; about half the covariance between larval traits was explained by inter-site differences (between-site component of covariance  $\text{cov}_{(\text{SVL, larval period}), \text{site}} = -0.42$ ; within-site  $\text{cov}_{(\text{SVL, larval period}), \text{residual}} = -0.56$ ; we did not compute a family-level covariance because the family effect was not significant for SVL). At 18°C, neither between-site differences nor between-family differences explained a large part of the covariance between traits (between-site component of covariance  $\text{cov}_{(\text{SVL, larval period}), \text{site}} = -0.29$ ; within-site  $\text{cov}_{(\text{SVL, larval period}), \text{family}} = -4.54$ , residual covariance  $\text{cov}_{(\text{SVL, larval period}), \text{residual}} = -4.23$ ; note that variances and covariances are much higher at 18°C because many individuals have very long larval periods and small SVL).

### *Growth and differentiation in experimental rearing*

The change in SVL through successive development stages in the laboratory was measured only in spring 2008 at 18°C and was comparable to available field measures (Fig. 8.A, compare with Fig. 5). Differentiation rate was very similar also to what we observed in spring in the field. After hatching, there was no change in Gosner stage during for the first 30 d. After this date, limb buds developed and metamorphosis occurred quite quickly (within about 30 d, Fig. 8.B).

### **Sequential transfer experiment**

To determine the point in ontogeny at which environmental conditions switched the developmental trajectories of autumn larvae and induced the metamorphic SVL differences between cohorts, we transferred autumn tadpoles to the lab facilities at a constant 20°C after spending different periods of time in the field. Compared to the first sample of individuals collected as eggs, SVL at metamorphosis decreased from tadpoles collected in October to tadpoles collected in November and December. This pattern reversed when tadpoles were collected in January through April. Tadpoles sampled in February metamorphosed at a similar SVL as tadpoles hatched in the lab in October. Tadpoles collected in March showed the same SVL at metamorphosis as tadpoles collected in February. Finally, tadpoles collected in April metamorphosed at the highest SVL compared to all other tadpoles sampled before ( $p < 0.001$ , Fig. 9).

## DISCUSSION

The field survey revealed that both spring and autumn breeding strategies produced larval populations with similar survival rates, confirming that the Mediterranean populations of parsley frog in France breed successfully in both spring and autumn. However, these two breeding periods lead to large differences in larval development and growth: although they need a longer time to develop, autumn cohorts metamorphose earlier and at a larger size than spring cohorts. This difference is not a simple effect of lower temperature experienced by autumn tadpoles through winter, as a 2°C decrease in rearing temperature in the lab induced a longer larval period but a smaller size at metamorphosis. Lower temperature thus results in similar effects on tadpole development but opposite effects on tadpole growth in the field and in the lab. . This suggests that a shift in the developmental trajectory, resulting in a gain in growth before metamorphosis, occurs during winter in the field and is qualitatively different from the response to a small decrease in temperature. The sequential transfer experiment suggest that the shift in developmental trajectories of autumn larval compared to spring larvae occurs in December, when temperatures are very low.

### **Effect of spawning time on larval development**

Our field data confirmed that the two cohorts of parsley frog undergo different growth and development trajectories. During the first month, when the tadpoles of both cohorts experience similar temperatures, they exhibit the same growth curve. After the first 30 d, spring tadpoles continue to grow rapidly until metamorphosis whereas autumn tadpoles gradually slow their growth during winter. This observation is consistent with past studies (Diaz-Paniagua, 1988, Guyétant et al., 1999, Richter-Boix et al., 2006).

After overwintering under cold temperatures of nearly 5°C, the autumn cohort undergoes a sharp increase in growth before they metamorphose and this allows them to metamorphose as

juveniles that are 25% larger than the spring cohort. The only field study that we are aware of showing an impact on breeding date on larval size was a recent study on *Rana temporaria*. Loman and colleagues (2009) described developmental differences in the field due to differences in spawning dates (by 10 days): the late-laid cohort had longer larval period and was bigger (10% increase in body length and 17% in body mass) than early-laid individuals. Unfortunately, the mechanisms for such change in body size were not explored.

### **Potential origins of developmental differences**

Because cold temperatures are well known for slowing down growth and development in poikilotherms (Angilletta *et al.*, 2002), the difference in temperature experienced by the spring and autumn cohorts was the most obvious candidate to explain the change in growth and development between them. As expected, the drop in temperature we tested in the lab induced a much longer development, in agreement with many other studies on anuran larval period (Blouin, 1992b, Blouin and Brown, 2000, Newman, 1998, Orizaola and Laurila, 2009, Sommer and Pearman, 2003).

Interestingly, a reduction in temperature had opposite effects on size at metamorphosis and larval period in the laboratory compared to the field. In addition, in the laboratory, all other sources of variation (among populations, within population) generated negative covariances between size at metamorphosis and larval period, just as the moderate (2°C) change in temperature did. Therefore, the pattern observed in our lab experiments is a negative correlation between larval period and size at metamorphosis. This is not consistent with the long development - large size at metamorphosis syndrome observed in the overwintering cohort in the field; it also differs from previous results showing positive phenotypic correlations between the two traits in amphibians (Berven, 1987, Laurila *et al.*, 2002) or positive responses of both traits to cold temperature (Berven, 1982, Blouin, 1992a, Blouin and

Brown, 2000, Newman, 1998, Orizaola and Laurila, 2009, Sommer and Pearman, 2003). To conclude, our field observations are in line with lab experiments on other species for both traits whereas our lab experiments are not in agreement with similar experiments on other species nor with field observations for effect of temperature on size at metamorphosis. However, both lab experiments on other species and field observations implies larger temperature drops (at least 5°C in lab experiments) than was performed for parsley frog in controlled rearing conditions.

The physiological effect of temperature on amphibian metamorphosis has been studied in detail by Smith-Gill and Berven in *Rana pipiens*, *R. sylvatica* and *R. clamitans* (Smith-Gill and Berven, 1979). They suggest that cold temperature has a negative effect on differentiation (since it inhibits thyroxin output) and on growth but temperature threshold of both physiological processes differ: growth continues at a lower temperature than differentiation. This is in agreement with observations of temperature-induced positive correlations between larval period and juvenile size in many amphibians (Berven, 1982, Blouin, 1992a, Blouin and Brown, 2000, Newman, 1998, Orizaola and Laurila, 2009, Sommer and Pearman, 2003) and with our field observations. According to this hypothesis of different temperature thresholds for growth and differentiation, autumn tadpoles are expected to benefit from more time to grow during winter when differentiation is delayed compared to spring tadpoles.

The apparently contradictory observation of lower size at metamorphosis in tadpoles reared at 18°C (compared to 20°C) and negative correlations between juvenile size and larval period in the laboratory can also be reconciled with this hypothesis if we assume that the threshold temperature below which differentiation stops is lower than 18°C and that slope of growth rate against temperature is steeper than the slope of differentiation rate against temperature. Under those two hypotheses, the decrease of growth rate at 18°C would be higher than the decrease of differentiation rate resulting in smaller juveniles. .

Moreover the two previous hypotheses are consistent with the results of our transfer experiment. Precisely, autumn larvae sampled before winter have faced a decrease in temperature in the field ( $16.6 \pm 2^{\circ}\text{C}$  mean water temperature  $\pm$  S.D measured in October (from first to second sampling) and  $10.4 \pm 1.6^{\circ}\text{C}$  in November) which was probably above the potential differentiation threshold. Consequently, when put in favourable conditions, they metamorphosed at smaller size than individuals reared in the lab during their entire larval development (showing the same pattern as we observed in our temperature manipulation experiment). However, as soon as tadpoles experienced very low temperatures in the field ( $7.8 \pm 1.8^{\circ}\text{C}$  in December,  $8.7 \pm 1.6^{\circ}\text{C}$  in January), presumably above the differentiation threshold, they metamorphose at bigger size and finally exceed the SVL at metamorphosis of spring tadpoles after two additional months of growth and differentiation ( $10.2 \pm 2.7^{\circ}\text{C}$  in February,  $15.2 \pm 2.9^{\circ}\text{C}$  in March).

It would be interesting to establish the real differentiation and growth curves in response to temperature for this particular species and would also allow us to determine the growth and differentiation threshold proposed above.

## Conclusions

Autumn tadpoles, which are bigger and metamorphose sooner than spring tadpoles may benefit from higher post-metamorphic survival. RichterBoix *et al.* (2006) showed that bigger parsley frog juveniles had enhanced jumping capacities: therefore bigger toadlets may be less prone to predation. Moreover, autumn juveniles may benefit from additional time to grow before the harsh dry season, compared to spring juveniles. In several amphibian species, such differences in larval traits lead to subsequent fitness variation (Altwegg and Reyer, 2003, Berven, 1990, Smith, 1987). Given that the proportion of eggs that reach the juvenile stage is not different between the two cohorts, autumn clutches may yield more long-term fitness



benefits than spring clutches to an individual. Therefore, in the parsley frog, adult temporal breeding strategy has an important impact on offspring fitness. It should however be mentioned that the choice to breed in autumn or in spring may also respond to constraints on adults (in particular energetic constraints).

Parsley frog shows an interesting breeding strategy that probably enables it to face unpredictable environments (in particular temporary ponds typical of the Mediterranean regions). Our results indicate that breeding in autumn is more beneficial for this species in our region. It could be argued that Parsley frog should breed only in autumn but the system may not be in equilibrium. More research on this species is needed to determine the potential evolution of its breeding system. In particular, autumn breeding is observed mainly in Mediterranean regions but is sometimes observed in northern part of parsley frog range (Destre et al., 2000, LPO-Aveyron, 2008, Thirion et al., 2002, Thomas et al., 2003). However, in those northern regions, breeding activity produces no juvenile. Global warming is expected to make autumn breeding more favourable and successful in those northern regions, possibly ending with the same breeding pattern that we observed in southern France.

Change in amphibian phenology could lead, as this is the case for parsley frog to variation in larval fitness and presumably in species dynamic. However, this study showed quite well that larvae of some amphibian species could show very plastic response to diverse environments and adapt to drastic change in environment. Moreover Reading *et al* showed that earlier breeding in *Bufo bufo* resulted in earlier metamorphosis but higher mortality (Reading and Clarke, 1999). Thus both benefits and costs may result from breeding change making assumptions on population persistence somewhat tricky. Besides, amphibian species often composed complex assemblage and it is probable that analysing the effect of breeding change (in response to climate) at the level of amphibian community would be of great interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by a grant from Agence Nationale de la Recherche (SCOBIM JCJC 0002). We are grateful to Vincent Mouret, Alain Fizesan and Denis Rey who did field work. Thanks to Joëlle Caillibotte and Paul Reder and anonymous land owners who allow us to work on their ponds. Experimental assistance was given by Virginie Dupuy, Joy Folly and particularly Jean-Marc Donnay. We also thank Pierre Joly for interesting discussions.

## REFERENCES

- Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J. & Ram, S. J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36-42.
- Altwegg, R. & Reyer, H. U. (2003) Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution*, **57**, 872-882.
- Angilletta, M. J., Niewiarowski, P. H. & Navas, C. A. (2002) The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*, **27**, 249-268.
- Audo, M. C., Mann, T. M., Polk, T. L., Loudenslager, C. M., Diehl, W. J. & Altig, R. (1995) Food-Deprivation during Different Periods of Tadpole (*Hyla-Chrysoscelis*) Ontogeny Affects Metamorphic Performance Differently. *Oecologia*, **103**, 518-522.
- Beebee, T. J. C. (1995) Amphibian Breeding and Climate. *Nature*, **374**, 219-220.
- Beebee, T. J. C. (2002) Amphibian phenology and climate change. *Conservation Biology*, **16**, 1454-1454.
- Beebee, T. J. C. & Griffiths, R. A. (2005) The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, **125**, 271-285.
- Berven, K. A. (1982) The genetic basis of altitudinal variation in the wood frog *Rana sylvatica* II. An experimental analysis of larval development. *Oecologia*, **52**, 360-369.
- Berven, K. A. (1987) The Heritable Basis of Variation in Larval Developmental Patterns within Populations of the Wood Frog (*Rana-Sylvatica*). *Evolution*, **41**, 1088-1097.
- Berven, K. A. (1990) Factors Affecting Population Fluctuations in Larval and Adult Stages of the Wood Frog (*Rana-Sylvatica*). *Ecology*, **71**, 1599-1608.
- Blaustein, A. R., Belden, L. K., Olson, D. H., Green, D. M., Root, T. L. & Kiesecker, J. M. (2001) Amphibian breeding and climate change. *Conservation Biology*, **15**, 1804-1809.

- Blouin, M. S. (1992a) Comparing Bivariate Reaction Norms Among Species - Time and Size At Metamorphosis In 3 Species of Hyla (anura, Hylidae). *Oecologia*, **90**, 288-293.
- Blouin, M. S. (1992b) Genetic Correlations among Morphometric Traits and Rates of Growth and Differentiation in the Green Tree Frog, Hyla-Cinerea. *Evolution*, **46**, 735-744.
- Blouin, M. S. & Brown, S. T. (2000) Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. *Oecologia*, **125**, 358-361.
- Both, C., Artemyev, A. V., Blaauw, B., Cowie, R. J., Dekhuijzen, A. J., Eeva, T., Enemar, A., Gustafsson, L., Ivankina, E. V., Jarvinen, A., Metcalfe, N. B., Nyholm, N. E. I., Potti, J., Ravussin, P. A., Sanz, J. J., Silverin, B., Slater, F. M., Sokolov, L. V., Torok, J., Winkel, W., Wright, J., Zang, H. & Visser, M. E. (2004) Large-scale geographical variation confirms that climate change causes birds to lay earlier. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **271**, 1657-1662.
- Carey, C. & Alexander, M. A. (2003) Climate change and amphibian declines: is there a link? *Diversity and Distributions*, **9**, 111-121.
- Crick, H. Q. P., Dudley, C., Glue, D. E. & Thomson, D. L. (1997) UK birds are laying eggs earlier. *Nature*, **388**, 526-526.
- Destre, R., d'Andurain, P., Fonderflick, J., Parayre, C. & Coll., A. (2000) *Faune sauvage de Lozère. Les vertébrés*.
- Diaz-Paniagua, C. (1988) Temporal segregation in larval amphibian communities in temporary ponds at a locality in SW Spain. *Amphibia-Reptilia*, **9**, 15-26.
- Gibbs, J. P. & Breisch, A. R. (2001) Climate warming and calling phenology of frogs near Ithaca, New York, 1900-1999. *Conservation Biology*, **15**, 1175-1178.
- Gosner, K. L. (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, **16**, 183-190.

- Guyetant, R., Temmermans, W. & Avrillier, J. N. (1999) Phenology of the reproduction of *Pelodytes punctatus* Daudin, 1802 (Amphibia, Anura). *Amphibia-Reptilia*, **20**, 149-160.
- Jakob, C., Poizat, G., Veith, M., Seitz, A. & Crivelli, A. J. (2003) Breeding phenology and larval distribution of amphibians in a Mediterranean pond network with unpredictable hydrology. *Hydrobiologia*, **499**, 51-61.
- Jourdan-Pineau, H., David, P. & Crochet, P. A. (2010) Plastic rather than genetic differences between seasonal breeding cohorts in Mediterranean Parsley frog, *Pelodytes punctatus*. *submitted*.
- Laurila, A., Karttunen, S. & Merila, J. (2002) Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. *Evolution*, **56**, 617-627.
- Loman, J. (2009) Primary and secondary phenology. Does it pay a frog to spawn early? *Journal of Zoology*, **279**, 64-70.
- LPO-Aveyron. (2008) *Faune sauvage en Aveyron - Atlas des vertébrés*, Rodez.
- Merila, J., Laurila, A., Pahkala, M., Rasanen, K. & Laugen, A. T. (2000) Adaptive phenotypic plasticity in timing of metamorphosis in the common frog *Rana temporaria*. *Ecoscience*, **7**, 18-24.
- Miller-Rushing, A. J. & Primack, R. B. (2008) Global warming and flowering times in Thoreau's concord: A community perspective. *Ecology*, **89**, 332-341.
- Møller, A. P. (2008) Climate change and micro-geographic variation in laying date. *Oecologia*, **155**, 845-857.
- Morin, P. J., Lawler, S. P. & Johnson, E. A. (1990) Ecology and Breeding Phenology of Larval *Hyla-Andersonii* - the Disadvantages of Breeding Late. *Ecology*, **71**, 1590-1598.

- Newman, R. A. (1998) Ecological constraints on amphibian metamorphosis: interactions of temperature and larval density with responses to changing food level. *Oecologia*, **115**, 9-16.
- Orizaola, G. & Laurila, A. (2009) Microgeographic variation in temperature-induced plasticity in an isolated amphibian metapopulation. *Evolutionary Ecology*, **23**, 979-991.
- Parmesan, C. (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **37**, 637-669.
- Perry, A. L., Low, P. J., Ellis, J. R. & Reynolds, J. D. (2005) Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science*, **308**, 1912-1915.
- R-Development-Core-Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria.
- Reading, C. J. (2003) The effects of variation in climatic temperature (1980-2001) on breeding activity and tadpole stage duration in the common toad, *Bufo bufo*. *Science of the Total Environment*, **310**, 231-236.
- Reading, C. J. & Clarke, R. T. (1999) Impacts of climate and density on the duration of the tadpole stage of the common toad *Bufo bufo*. *Oecologia*, **121**, 310-315.
- Relyea, R. A. (2007) Getting out alive: how predators affect the decision to metamorphose. *Oecologia*, **152**, 389-400.
- Richter-Boix, A., Llorente, G. A. & Montori, A. (2004) Responses to competition effects of two anuran tadpoles according to life-history traits. *Oikos*, **106**, 39-50.
- Richter-Boix, A., Llorente, G. A. & Montori, A. (2006) Breeding phenology of an amphibian community in a Mediterranean area. *Amphibia-Reptilia*, **27**, 549-559.
- Salvador, A. & Paris, M. G. (2001) *Anfibios Españoles*.

- Smith-Gill, S. J. & Berven, K. A. (1979) Predicting Amphibian Metamorphosis. *American Naturalist*, **113**, 563-585.
- Smith, D. C. (1987) Adult Recruitment in Chorus Frogs - Effects of Size and Date at Metamorphosis. *Ecology*, **68**, 344-350.
- Sommer, S. & Pearman, P. B. (2003) Quantitative genetic analysis of larval life history traits in two alpine populations of *Rana temporaria*. *Genetica*, **118**, 1-10.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L. & Waller, R. W. (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, **306**, 1783-1786.
- Thirion, J.-M., Grillet, P. & Geniez, P. (2002) *Les Amphibiens et les Reptiles du centre-ouest de la France - Région Poitou-Charentes et départements limitrophes*, Mèze (France).
- Thomas, J. P., Faugier, C., Issartel, G. & Jacob, L. (2003) *Reptiles et amphibiens d'Ardèche*, CORA/Parc naturel régional des Monts d'Ardèche.
- Toxopeus, A. G., Ohm, M. & Arntzen, J. W. (1993) Reproductive biology of the parsley frog, *Pelodytes punctatus*, at the northernmost part of its range. *Amphibia-Reptilia*, **14**, 131-147.
- Walther, G. R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J. C., Fromentin, J. M., Hoegh-Guldberg, O. & Bairlein, F. (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature*, **416**, 389-395.
- Wilbur, H. M. (1980) Complex Life-Cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**, 67-93.

## FIGURE LEGENS

Figure 1: Survival until metamorphosis (as a proportion of number of metamorphs produced from eggs laid, mean  $\pm$  SEM) observed for individuals spawned in autumn (grey bar) and in spring (black bar). The difference is not significant (Season effect,  $p=0.75$ )

Figure 2: The larval period (A) and snout-vent length at metamorphosis (B) of parsley frogs larvae based on field surveys of 19 ponds that contained either spring or autumn breeding cohorts. All data are mean  $\pm$  SEM

Figure 3: Larval growth (Snout-vent length over time, solid lines) and water temperature (dashed line) of parsley frog larvae based on field surveys. The 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> X-scales represent the tadpole age for autumn and spring laid individuals, respectively. Larval growth curve of autumn and spring larvae are in grey and in black, respectively. Each point of the growth curve represents the mean value  $\pm$  2 SEM of SVL in a temporal window of 10 days. The final point of each growth curve corresponds roughly to a mean Gosner stage 35 (during toe development). For water temperature, each point represents the mean value  $\pm$  2 SEM.

Figure 4: Larval differentiation curves of autumn (grey, dashed line) and spring (black, solid line) parsley frog tadpoles based on field survey. Each point represents the mean value ( $\pm$  2 SEM) of Gosner stages in a temporal window of 20 days. First X-scale: time as real dates; 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> X-scales: age of autumn and spring tadpoles, respectively. The final data point of spring tadpole differentiation was not measured since individuals reached metamorphosis between two surveys.

Figure 5: Stage-related size of autumn (grey) and spring (black) tadpoles measured in the field in 2009. All data are mean  $\pm$  SEM. All SVL are significantly different between cohorts ( $p<0.01$ ) except for Gosner stage 39-41. Within season, there was a significant



difference between SVL of Gosner stage 39-41 and 42-44 ( $p < 0.05$ ) in autumn and spring but not between other consecutive stages.

Figure 6: Larval period (A) snout-vent length at metamorphosis(B) measured in the lab on spring tadpoles reared at 18°C (white bars) in spring 2008 and 20°C (hatched bars) in autumn 2009 for the sites Boissiere and Seuilles (Boissiere  $n = 43$  and 21 / Seuilles  $n = 40$  and 52 at 18°C and 20°C, respectively). All data are mean  $\pm$  SEM. Both larval periods and size at metamorphosis are significantly different ( $p < 0.001$ ).

Figure 7: Correlation between SVL at metamorphosis and larval period at 18°C in spring 2008 (A) and at 20°C in spring and autumn 2008 (B). Ellipses (dashed lines) are represented at 90% of the data distribution. Note the differences in scales of the larval period axis.

Figure 8: Stage-related snout-vent length (A) and larval differentiation (B) of spring tadpoles reared at 18°C in the lab (all stage-sizes are significantly different from following stage sizes,  $p < 0.001$ ); On panel B, Gosner stages (shown as mean  $\pm$  2 SEM on the Y-axis) were measured at four different dates (first point is hatching date) thus we plotted, on the X-axis the mean age of measured tadpoles (range values are 20-26, 29-36, 40-48 and 52-58 days).

Figure 9: SVL at metamorphosis after partial rearing in the lab of tadpoles sampled from Roubiac pond each month from October 2009 to March 2010. Data are means  $\pm$  SEM. SVL are significantly different between successive months ( $p < 0.001$ ). Numbers indicated below months are the number of days elapsed since the first sample (as eggs) of individuals.

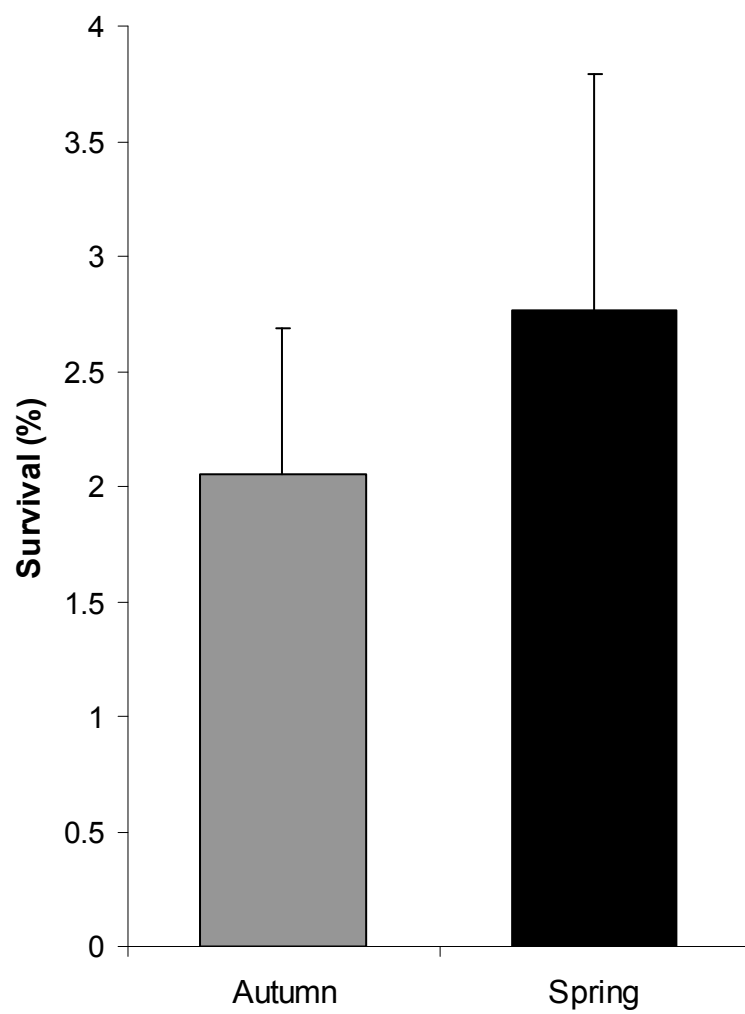


Figure 1

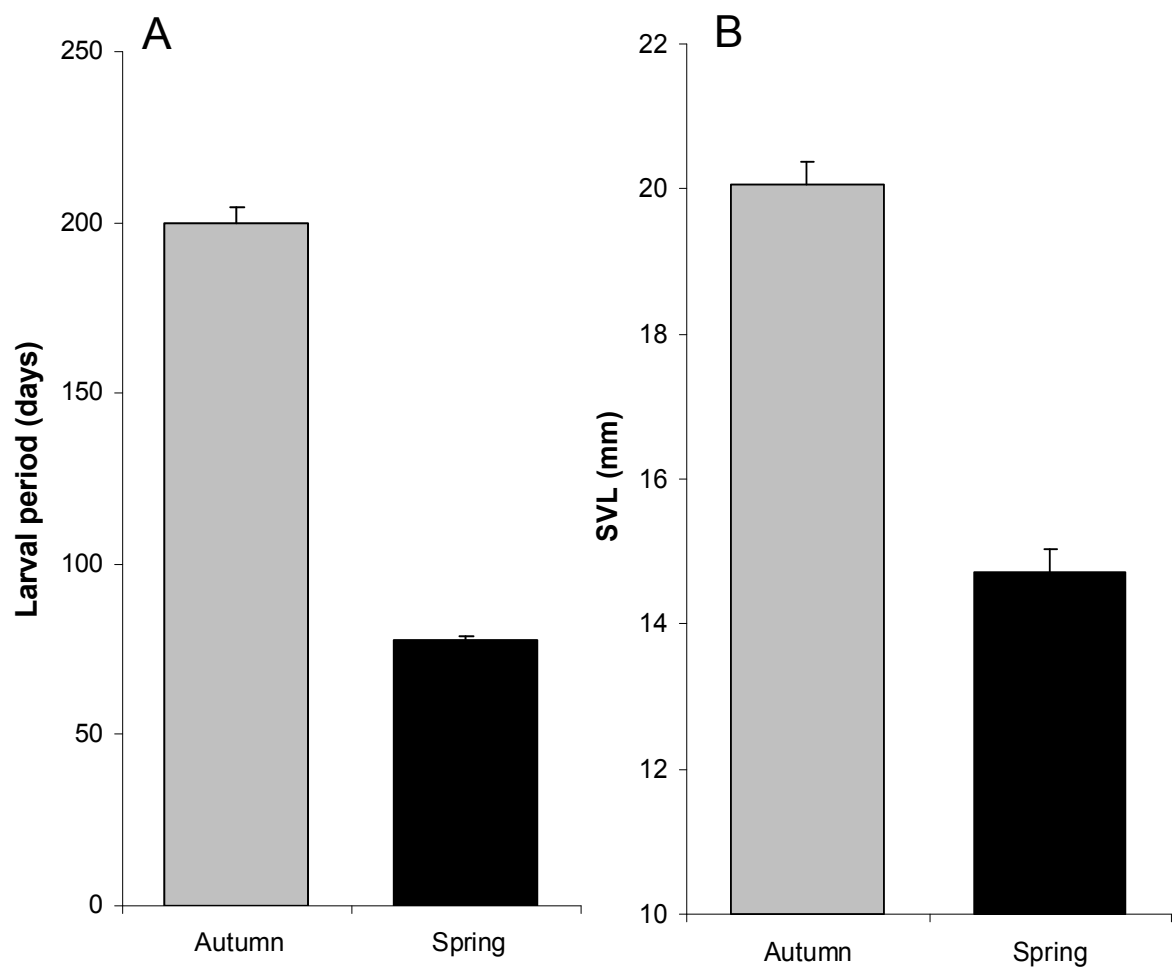


Figure 2

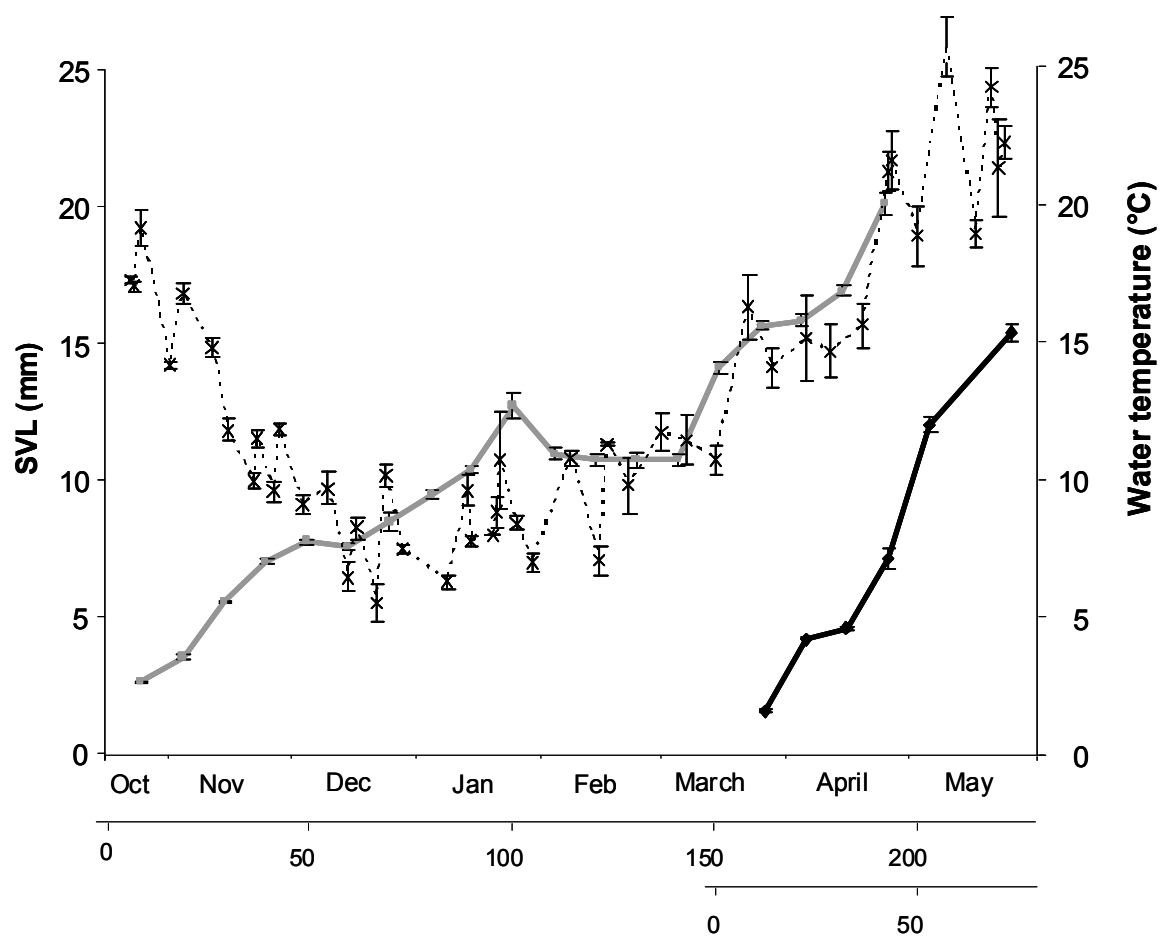


Figure 3

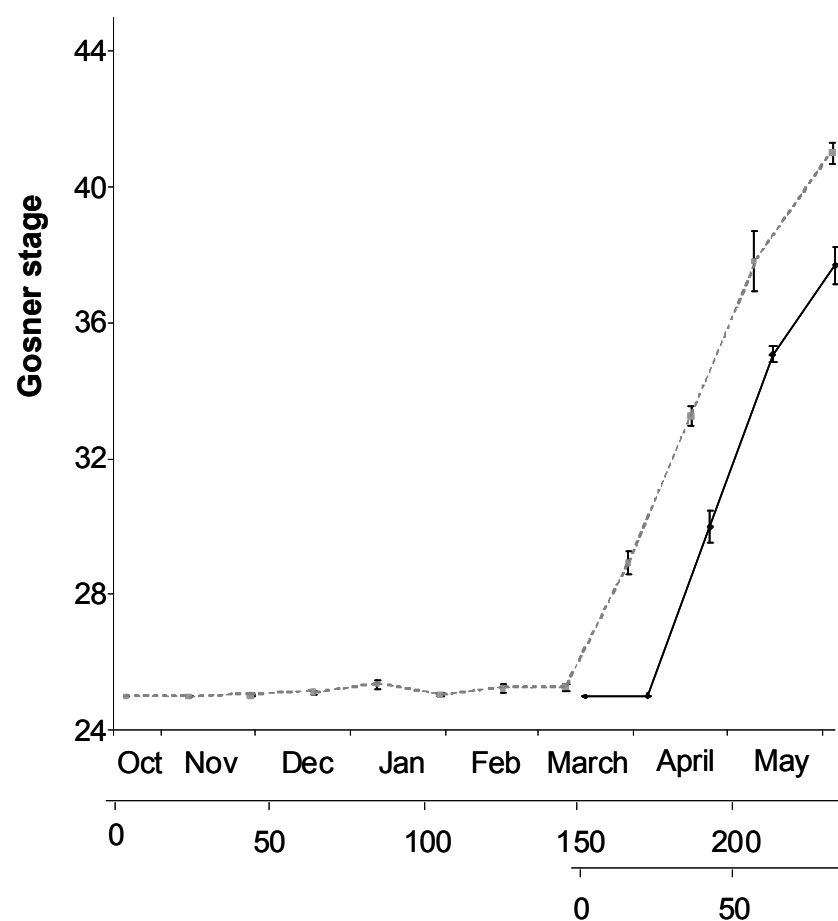


Figure 4

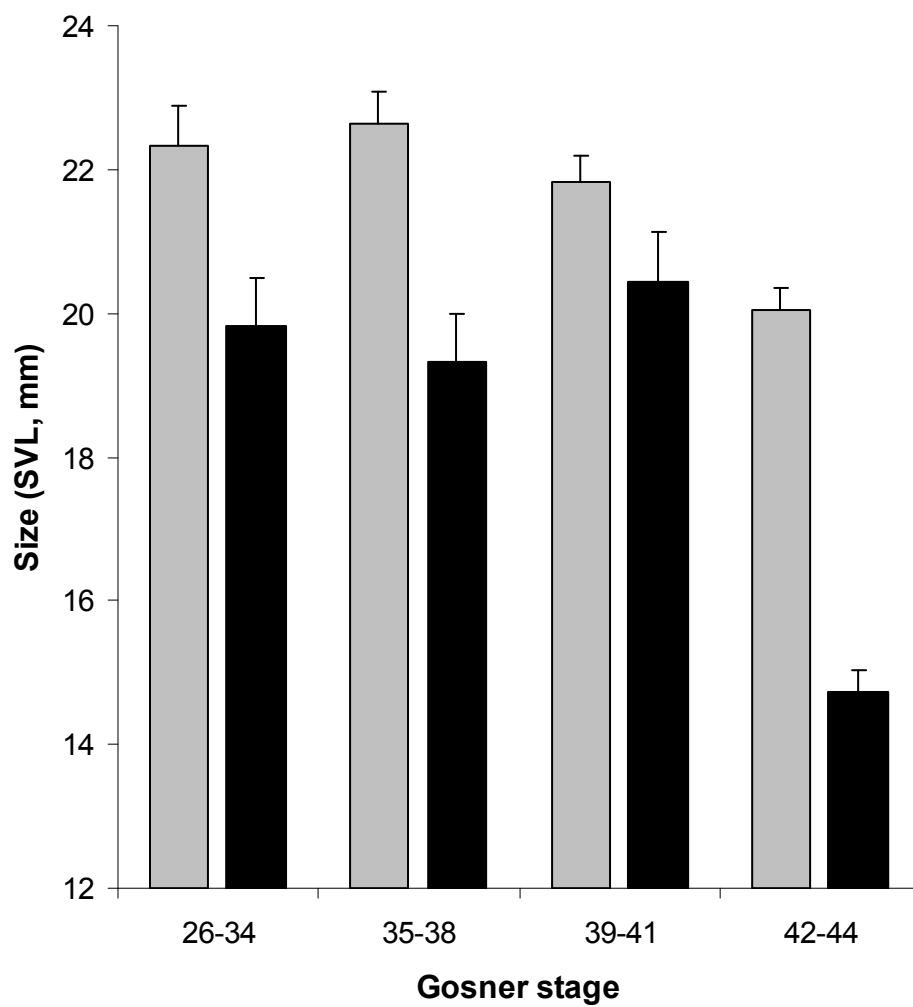


Figure 5

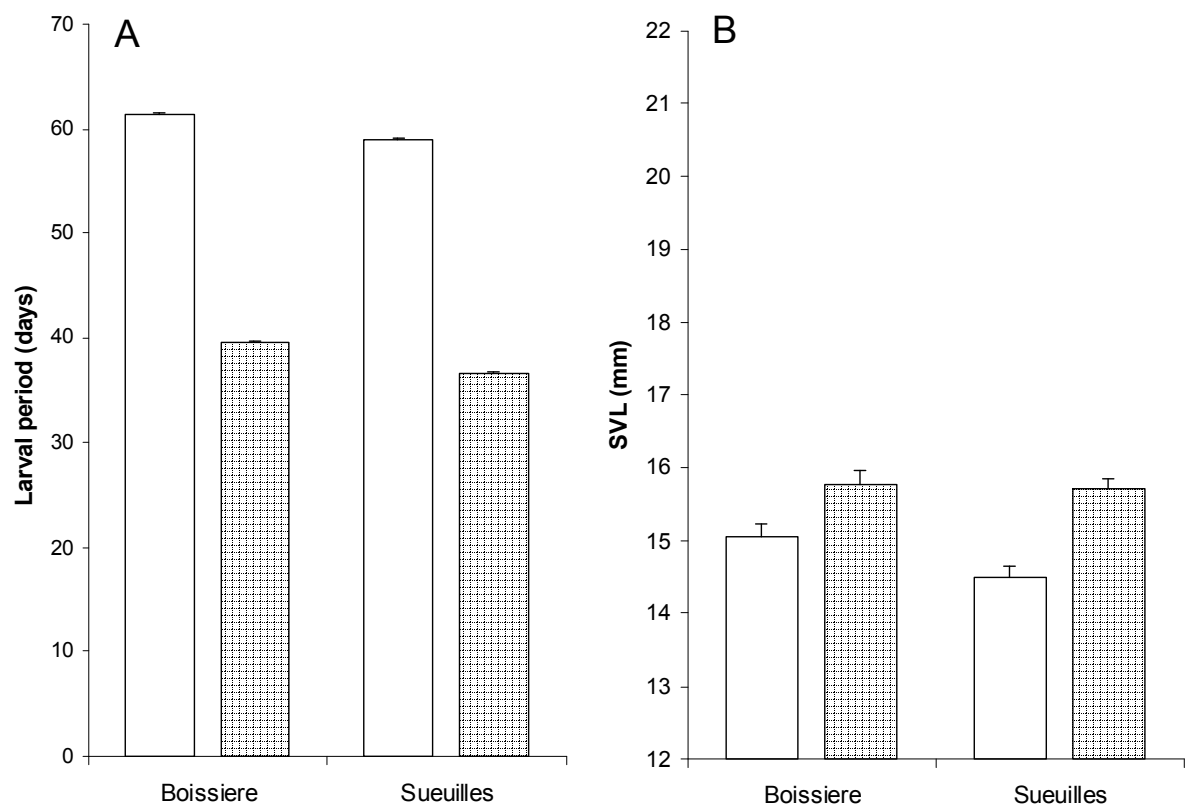


Figure 6:

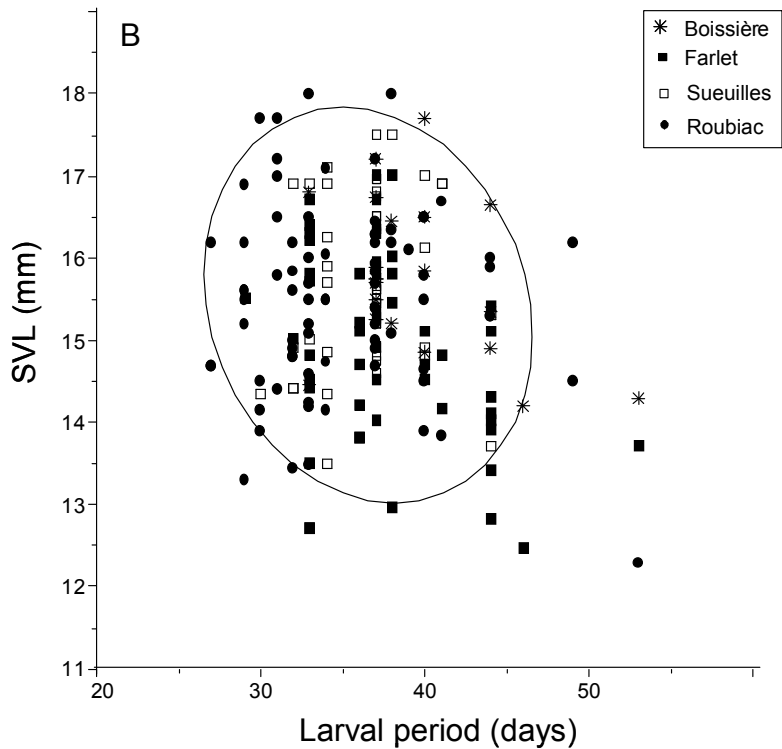
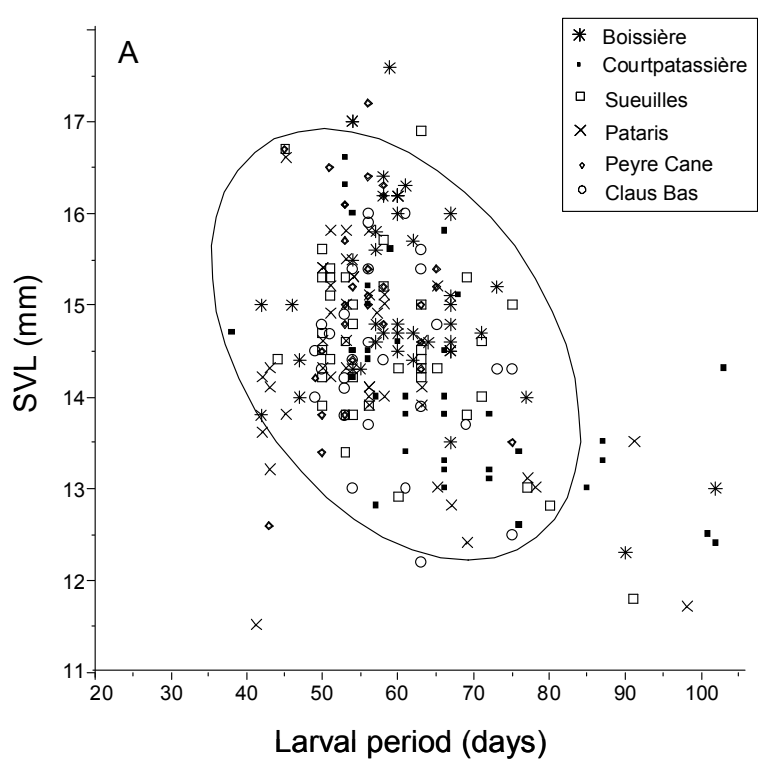


Figure 7



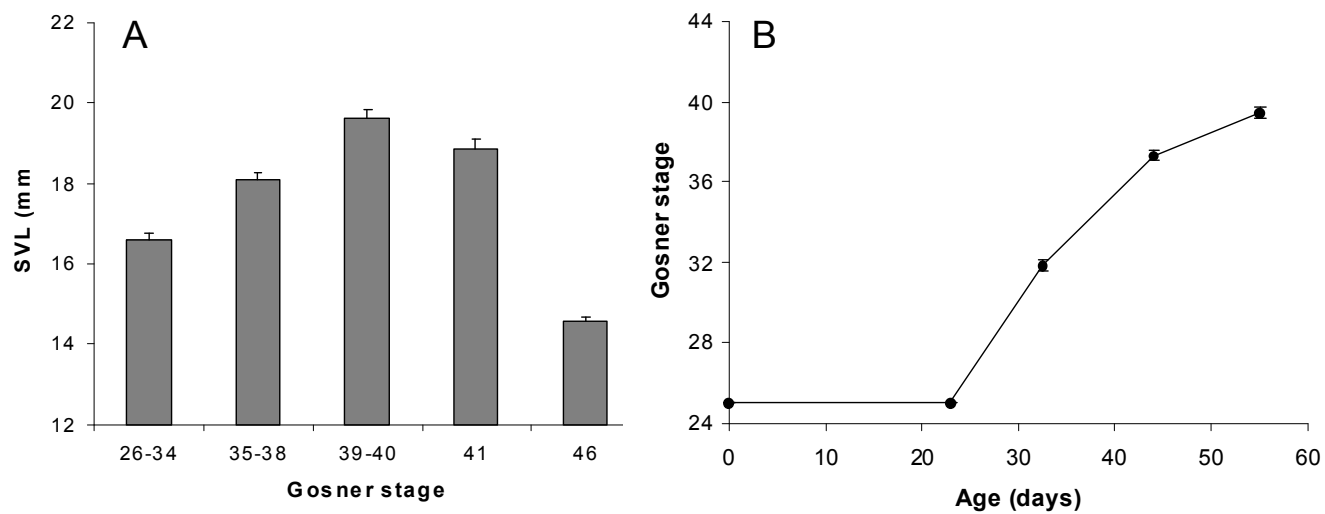


Figure 8

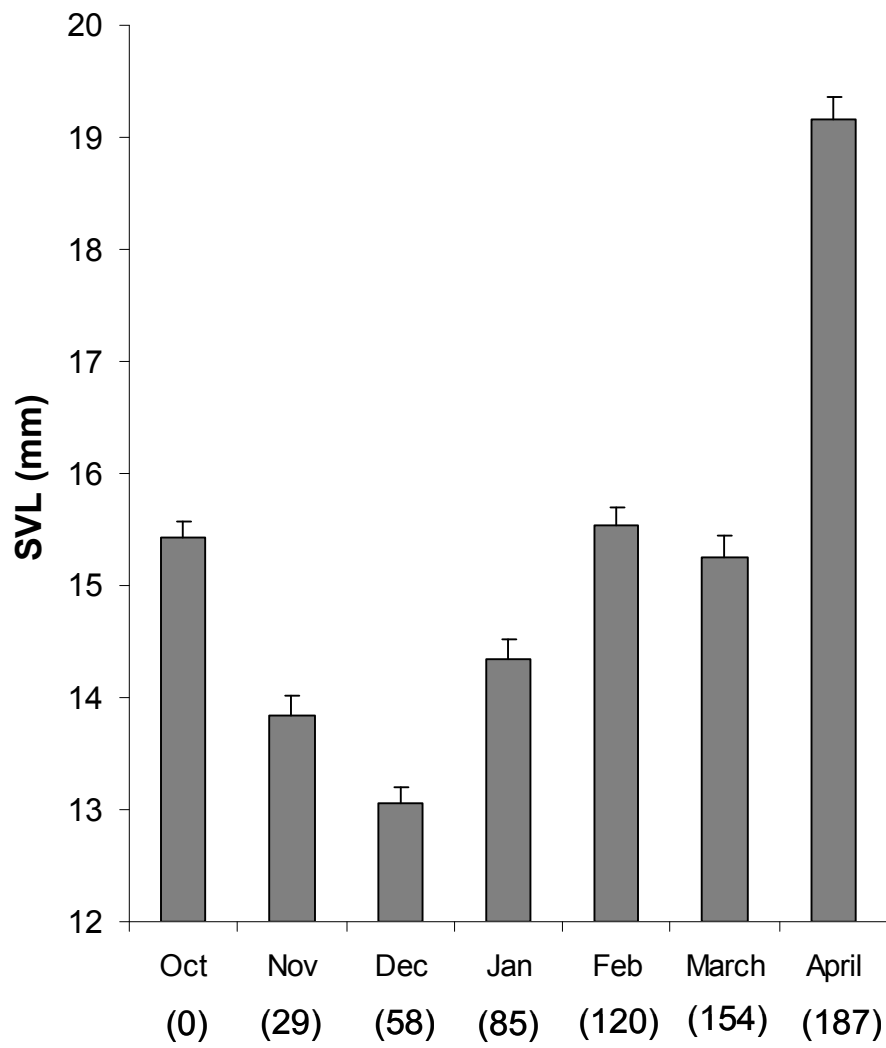


Figure 9

Table 1: Summary of analyses with mixed linear models for larval period and SVL at metamorphosis measured in the lab experiments. Interactions between effects were tested and were all non significant. ~ indicates a random effect. \*, \*\* and \*\*\* indicate significant effects where p values < 0.05, 0.001 and 0.0001, respectively.

Source	ndf	Larval period				SVL at metamorphosis			
		Mean Square	Variance component	F ratio		Mean Square	Variance component	F ratio	
<i>Spring 2008 (18°C)</i>									
Block	3	224.992		2.15		0.79941		0.77	
Population~	5	462.247	16.25	2.25		6.22323	0.084	4	**
Family(population)~	27	211.619	7.55	2.02	**	1.58575	0.137	1.53	
Residual	188	104.71	104.71			1.033	1.033		
<i>Spring 2009 (20°C )</i>									
Block	3	29.9077		5.61	**	3.53626		2.67	
Population~	1	68.4444	1.86	5.83	*	5.05397	-0.025	4.08	
Family(population)~	10	13.3241	2.74	2.5	*	1.21803	0.18	0.92	
Residual	39	5.335	5.33			1.32	1.32		
<i>Autumn 2009 (20°C )</i>									
Block	2	233.733		21.88	***	5.31482		5.57	**
Population~	3	62.6949	3.52	1.82		7.39257	0.077	5.02	*
Family(population)~	16	36.9959	0.85	3.46	***	1.52915	0.178	1.6	
Residual		10.68	10.68			0.95	0.953		
<i>Boissière and Seuilles</i>									
Temperature	1	16552.9		104.415	***	32.0475		23.4862	***
Block (temperature)	5	181.762		3.7462	**	1.50567		1.5682	
Population~	1	199.829	0.71	1.3078		4.5034	0.047581	3.3521	
Family(population, temperature)~	17	157.575	15.07	3.2477	***	1.36102	0.055407	1.4175	
Residual	131	48.52	48.52			0.96014	0.960138		
<i>All experiments, all populations</i>									
Temperature	1	16631.4		280.3826	***	31.9784		30.8607	***
Cohort (temperature)	1	1057.61		17.8298	***	1.79539		1.7326	
Block (experiment)	8	153.129		2.5816	**	2.9197		2.8177	**
Population~	7	365.057	6.172015	3.3527	**	8.03132	0.159523	5.6949	***
Family~ (population, experiment)~	53	121.726	9.707622	2.0521	***	1.50716	0.073255	1.4545	*
Residual	359	59.317	59.31676			1.03622	1.036217		

Appendix A: list of the surveyed pond and geographic localization.

Pond name	Area	Latitude	Longitude
Anduze	Gardiole	43.4787	3.7318
Bergerie	Cournonterral	43.5803	3.7019
Boissière	Notre-Dame de Londres	43.8337	3.7461
Bouillès Ouest	Cournonterral	43.5694	3.6951
Claus bas	Notre-Dame de Londres	43.8256	3.8761
Combe l'Escure	Cournonterral	43.5733	3.6994
Courtpatassière	Cournonterral	43.5603	3.6686
Farlet	Gardiole	43.4908	3.7415
Fertalière	Cournonterral	43.5690	3.6812
Fesq	Notre-Dame de Londres	43.8028	3.7919
GMP	Cazevieille	43.7708	3.7945
Jasses	Notre-Dame de Londres	43.8657	3.7828
Logis du Bois	Notre-Dame de Londres	43.8406	3.7462
Mège	Gardiole	43.4936	3.7544
Pataris	Cournonterral	43.5694	3.6951
Peyre Cane	Notre-Dame de Londres	43.7622	3.7247
Pierre Tintante	Gardiole	43.4826	3.7341
Pioch noir	Gardiole	43.4947	3.7544
PMP	Cazevieille	43.7708	3.7950
Roubiac	Cazevieille	43.7597	3.7879
SEGA	Notre-Dame de Londres	43.8147	3.7817
Seuilles	Cazevieille	43.7597	3.7772

Appendix B: N (number of individuals measured for both traits), mean and SEM of SVL and larval period measured on tadpoles reared in the laboratory for each site in each experiment (S08 for spring 2008, S09 for spring 2009 and A09 for autumn 09)

	N			SVL						Larval period					
Population	S08	S09	A09	S08		S09		A09		S08		S09		A09	
Boissière	43		21	15.06	0.16			15.76	0.21	61.3	1.66			39.48	1.01
Claus Bas	29			14.41	0.18					58.34	1.4				
Farlet		23	30			15.04	0.25	14.79	0.21			34.96	0.65	39.73	0.8
Pataris	44			14.32	0.16					56.52	1.81				
Courtpatassière	38			14.1	0.17					66.55	2.36				
Peyre Cane	30			15.08	0.2					55.67	1.18				
Roubiac		31	49			15.64	0.22	15.42	0.15			31.35	0.54	37.53	0.7
Seuilles	40		52	14.51	0.15			15.71	0.14	58.98	1.62			36.54	0.39

## Chapitre 6

---

# Hétérogénéité génétique des petites populations : impact sur les relations génotype/phénotype ?

Une question majeure en écologie évolutive mais surtout en biologie de la conservation est l'impact de la fragmentation sur le devenir des populations. Le Pélodyte vit en populations plus ou moins fragmentées et on s'attend à des effets négatifs de la fragmentation des populations sur leur persistance. Une façon de tester ces prédictions est d'étudier les relations entre **génotypes** et **phénotypes**.

En effet, on attend que la fragmentation ait des conséquences sur la structure génétique des populations en diminuant la **taille efficace** des populations et en réduisant les flux de gènes entre populations. Ceci a pour effet fréquent d'augmenter la consanguinité et s'il existe de l'hétérogénéité de consanguinité entre les individus, on peut s'attendre à voir des corrélations entre les niveaux de consanguinité (révélés par la mesure de l'hétérozygotie) et la **fitness**. Cette corrélation est le plus souvent positive et révèle l'effet de la dépression de consanguinité au sein de la population étudiée.

Cependant une petite population contient moins de reproducteurs et les descendants sont produits par peu de parents. C'est typiquement le cas chez le Pélodyte où l'on observe, dans les mares, un nombre limité de pontes qui génèrent parfois un très grand nombre de têtards. Ainsi il peut également y avoir une hétérogénéité des petites populations due à la structuration en famille. Cette hétérogénéité peut également provoquer des associations entre **génotypes** (plutôt allèles) et **phénotypes** spécifiques de chaque famille.

Nous avons ainsi étudié la nature de l'hétérogénéité génétique induite par la fragmentation : hétérogénéité de consanguinité et structuration en famille. Deux sites ont principalement servi à cette étude (Ruisseau et Fesq) et ont été échantillonnés juste après la ponte et à la fin du développement larvaire. Nous montrons ainsi qu'il y a peu de traces de consanguinité au sein de nos échantillons. Par contre, les cohortes larvaires sont structurées en un nombre limité de familles (d'après les analyses d'apparentement) et

ceci corrobore les observations d'un petit nombre de pontes sur le terrain. La mare du Fesq présente un plus petit nombre de familles que celle du Ruisseau (14 par rapport à 9 d'après la génétique et 9 et 43 pontes sur le terrain pour Fesq et Ruisseau, respectivement).

A partir d'expériences de génétique quantitative, nous évaluons l'héritabilité de la survie et de la croissance larvaire. Ces deux traits sont significativement héréditaires (0.16 pour la survie et 0.41 pour la croissance). Les familles présentent donc des **phénotypes** différents en terme de survie et de croissance larvaire. Les conditions sont, dès lors, réunies pour observer des relations entre les marqueurs neutres (qui vont être spécifiques d'une famille) et les **phénotypes**. Nous observons effectivement des associations nettes entre allèles et **phénotypes** : il y a une différenciation génétique significative entre les échantillons temporels et également au sein d'un échantillon si l'on sépare les individus en deux groupes selon leur taille. En dehors de la mare du Fesq, il n'y a jamais de corrélation entre hétérozygotie et **fitness**. Par contre, au Fesq, on observe une corrélation négative entre hétérozygotie et **fitness**, ce qui n'est pas fréquent.

Pour vérifier que cette corrélation n'est pas simplement un faux positif, nous utilisons des simulations pour vérifier l'impact du faible nombre de marqueurs, de familles et d'une forte **héritabilité** sur la proportion de faux positifs attendus. Nos résultats indiquent que ces conditions sont bien susceptibles de générer deux fois plus de faux positifs qu'attendus. Ceci ne suffit pas à rejeter la réalité de la corrélation observée pour le Fesq. La seule explication biologique de cette relation négative serait la présence de dépression hybride.

Ainsi le Pélodyte semble éviter la consanguinité même dans des populations de petite taille. Ceci peut résulter de capacités de discrimination qui lui permet d'éviter de se reproduire avec ses apparentés ou simplement d'une dispersion suffisante.

**Heterozygosity-fitness and Allele-fitness correlations in fragmented populations:  
the case of the parsley frog, *Pelodytes punctatus***

HELENE JOURDAN-PINEAU<sup>1</sup>, JOY FOLLY<sup>1</sup>

PIERRE-ANDRE CROCHET<sup>1</sup> and PATRICE DAVID<sup>1</sup>

1: Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5175 CNRS, 1919 route de Mende,  
34293 Montpellier cedex 5, France

**Submitted to Evolution**

*Received:*

*Keywords:* fitness, inbreeding, population genetics, quantitative genetics, relatedness, larval development, amphibian, *Pelodytes punctatus*

*Correspondence:* Hélène Jourdan-Pineau, CEFÉ, UMR 5175 CNRS, 1919 route de Mende,  
34293 Montpellier cedex 5, France; Fax: (+33) 4 67 41 21 38; Email:  
helene.jourdan@cefe.cnrs.fr

## ABSTRACT

Heterozygosity/fitness correlations (HFC) have been widely studied and described in the last decades. Theory predicts that positive HFC will emerge as a consequence of heterogeneity in inbreeding between individuals within populations and inbreeding depression. In this study, we documented two additional processes that affect genotype-phenotype correlations in small or fragmented populations, (i) genetic variation can be structured by other processes than inbreeding. For example, each generation may consist of a few discrete families. This can generate correlations between particular alleles and fitness traits (allele-fitness correlations or AFC) because families differ from each other with respect to both allele frequencies and phenotypes (ii) sets of small, isolated populations can accumulate outbreeding depression alleles, which can generate negative HFC. We investigated these processes in larval cohorts of an amphibian (*Pelodytes punctatus*) living in fragmented freshwater habitats. The microsatellite genetic structure of these cohorts revealed little inbreeding, and a pronounced family structure, consistent with the observation of limited numbers of egg masses in each site. This structure generated significant associations between allelic composition of individuals and fitness traits (growth, survival), especially when the number of families was low. In addition, we observed a significant correlation between heterozygosity and growth in one site. Surprisingly, this correlation was strongly negative and could not be explained by spurious effects due to family structure or multiple testing. We concluded that this correlation was due to the expression of outbreeding depression in the studied population.



## INTRODUCTION

Correlations between heterozygosity at neutral markers (MLH for multilocus heterozygosity) and fitness (heterozygosity- fitness correlations, HFC hereafter) have generated an impressive amount of empirical and theoretical research (see (Britten 1996; Chapman et al. 2009) for a review). Indeed, the widespread occurrence of HFC in wild populations is central to our understanding of subjects as varied as sexual selection (e.g. Charpentier et al. 2008; Oigarden et al. 2010; Reid and Keller 2010 for recent ideas) or the conservation of small populations (e.g. Blomqvist et al. 2010; Jaquierey et al. 2009).

Despite heated debates on the origin of HFC, available evidence indicate that HFC are generated by inbreeding; the existence of HFC in a given population is thus a useful indication of the occurrence of inbreeding and its genetic effects (Szulkin et al. 2010). Small population size, non-random mating, population admixture or bottlenecks all can produce inbreeding (Bierne et al. 2000b; Ohta 1971). In some natural contexts, e.g. habitat fragmentation, the identification of HFC can serve as a warning signal on the fitness costs of genetic erosion in wild populations (Szulkin et al. 2010).

Theoretical studies of HFC consider that it emerges as a result of variance in inbreeding level among individuals within populations, originating from both consanguineous and non consanguineous mating events or a mixture of migrants and residents in the analysed population (Szulkin et al. 2010). Yet, even in the absence of inbreeding, any form of intra-population structuring could potentially generate correlations between genotypes at neutral markers and phenotypic traits. This is because, as soon as a population can be partitioned into a few subgroups that differ from each others with respect to both genotype frequencies and phenotypes, one can expect a correlation to show up between these two variables in a mixed sample, more often than expected by chance in a sample of independently drawn individuals.

Classical HFC theory is a special case of this process (in which subgroups are defined as inbreeding classes, e.g. inbred versus outbred individuals).

In addition, when the sample is subdivided into a finite set of full-sibships (families), different families may differ by their allele frequencies and by their phenotypes, if the latter are heritable. This can generate correlations between heterozygosity and fitness if the fitter families are also more heterozygous (which takes us back to the classical, inbreeding-based, HFC theory) but it can also create random associations between some alleles (those that happen to be found in relatively fit families) and fitness (allele-fitness correlations, hereafter AFC). Family structure can be especially important in species where each pair can produce a large number of juveniles, or in species where a few males fertilize many females, each of which produces a few offspring.

Many amphibian species live in fragmented habitats (Cushman 2006), which may induce inbreeding within small populations (Andersen et al. 2004; Dixo et al. 2009; Lesbarreres et al. 2003). Moreover a few breeding pairs may produce a high number of larvae (Waldman and McKinnon 1993) hence pedigree differences between tadpoles may result in differential inbreeding. As a result, HFC have been documented in several species (Halverson et al. 2006; Lesbarreres et al. 2007; Schmeller et al. 2007). However, larval cohorts may be highly structured into families and this inner structure may dominate inbreeding heterogeneity. What is thus the real impact of inbreeding versus high family structure on phenotype-genotype relationships in small amphibian populations?

To answer these questions, we studied the relationship between genotype (at microsatellite markers) and phenotypes (larval survival and larval growth) in tadpole cohorts of natural populations of the parsley frog (*Pelodytes punctatus*). We first investigated the inner genetic structure of these populations by searching for indication of inbreeding in our samples and looking for kinship structure with relatedness analyses. We then analysed the phenotypic

consequences of this structure in terms of both HFC and AFC on larval growth and survival, as well as the (broad sense) heritability of these traits. Note that to observe relationship between genotype and phenotype, heritability *sensu stricto* is not strictly required, but large variance between families is necessary. Besides, as amphibian larval traits have been shown to be very important in predicting future fitness of individuals (for example, Altwegg and Reyer 2003; Smith 1987), correlations between heterozygosity and larval growth can be interpreted as HFC.

## MATERIAL AND METHODS

### *Studied species*

Parsley frog, *Pelodytes punctatus*, is a European anuran breeding mostly in ephemeral ponds and occupying open habitats during the terrestrial phase (Guyétant et al. 1999; Richter-Boix et al. 2006). Such combination of temporary ponds in open landscape is well represented in the Mediterranean region and the species is quite common there (Richter-Boix et al. 2006). As in most amphibian species, larvae are strictly dependent on ponds for their development (making sampling very easy) and suffer from a high mortality (>95% , Jourdan-Pineau et al. 2010a).

### *Study area*

The study area surrounds Montpellier (France, Hérault) and comprises 14 ponds situated in typical Mediterranean habitat among which 6 were used directly for HFC study and 8 for quantitative genetic experiments (Annex A). All sites used for genotyping were also part of a three-year field survey between 2007 and 2010. In the field, we counted the number of egg masses produced for each breeding event (for more details, see Jourdan-Pineau et al. 2010c).

### *Genetic sampling and genotyping for neutral molecular markers*

Tadpoles were sampled in 6 ponds: Ruisseau, Fesq, GMP, PMP, Combe and Bergerie (dates: 22<sup>nd</sup> Feb 2008 and 28<sup>th</sup> May 2008 for Ruisseau, 31<sup>st</sup> Oct 2007 and 20<sup>th</sup> March 2008 for Fesq, 15<sup>th</sup> Oct 2007 for GMP, 20<sup>th</sup> Nov 2007 for PMP, 29<sup>th</sup> Oct 2007 for Combe and 16<sup>th</sup> Oct 2007 for Bergerie). In Ruisseau and Fesq, larval cohort was sampled twice, at the beginning and at the end of the larval period. Sample size varied between sites and dates (Annex A).

Different sites were used to limit the impact of sampling on larval cohorts. For the same reason, the sample size is quite limited compared to the usual sample sizes of HFC studies.

DNA was extracted using a Chelex method based on Walsh *et al* (1991) and adapted for tadpole tissue (Jourdan-Pineau et al. 2009). DNA was amplified by PCR and genotyped with 6 microsatellite markers: PPU2, PU5, PPU10, PPU11, PPU15, PPU16 (Jourdan-Pineau et al. 2009) in a genotyper ABI Prism 3100 sequencer (Applied Biosystems). Genotypes were eye-checked under GENMAPPER 3.0 software (Applied Biosystems). Typing error rate was estimated around 3.5% based on replicated genotypes.

### *Genotype data analyses*

Expected heterozygosity ( $H_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ),  $F_{IS}$  (Weir and Cockerham 1984) values for each sample and  $F_{ST}$  between samples were computed with GENETIX (Belkhir et al. 1996)). Differences between  $H_o$  between the two samples in a site was tested using a Poisson log-linear model (R-Development-Core-Team 2008).  $F_{IS}$  and  $F_{ST}$  were tested with 1000 permutations. Tests of linkage disequilibrium were run with GENEPOP 4.0 (Raymond and Rousset 1995; Rousset 2008). We estimated the inbreeding with the parameter named  $g_2$  (implemented on the software  $R_{MES}$ ) which depends only on the mean and variance of inbreeding in the population and is (unlike  $F_{IS}$ ) not affected by null alleles or amplification failure (David et al. 2007). Pairwise relatedness among all individuals in the first and second

samples of Ruisseau and Fesq ponds was assessed with Kingroup v.2 (Goodnight and Queller 1999; Queller and Goodnight 1989).

Two methods were used to estimate the number of families making up each sample in Ruisseau and Fesq ponds: an estimation of the proportion of related individuals in each sample and a partition of individuals into sibships. The first approach compared the distributions of relatedness observed in the samples to distributions simulated for samples made of full-sibs individuals only and non-related individuals only. We then calculated the likelihood of the observed set of relatedness values assuming that a proportion  $a$  of the pairwise relatedness were taken in the distribution of full-sibs and a proportion  $1-a$  in the distribution of non-related individuals. We kept the  $a$  value that maximised this likelihood. Thus  $a$  estimates the proportion of full-sib pairs in the sample and  $1/a$  can be considered as an "effective number of families" (*i.e.*, the number of families which gave a proportion  $a$  of full sib pairs if those families were found at the same frequency in the sample). We also tested if the mean pairwise relatedness obtained on our samples differed significantly from those of null-distributions of non-related individuals (with the same population size and genetic diversity), by simulating one hundred null distributions and calculating the proportion of simulated values that were above the observed values.

For the second approach, we used the algorithms "Modified Simpson" and "Markov Chain Simpson" implemented in Kingroup v.2 to partition the larval samples into potential sibships (Goodnight and Queller 1999; Konovalov et al. 2005; Queller and Goodnight 1989). To perform this approach, we pooled temporal samples within each site so that family reconstruction depends on genetic data only, not on the date of sampling.

### *HFC analyses*

Two fitness traits were measured in this study: growth and survival. Growth was estimated by size at sampling (for Ruisseau and Fesq populations we used the size at the second sample since the first samples were taken on very young larvae with very little size variability). We know from field survey (Jourdan-Pineau et al. 2010c) that all tadpoles in a sample originated from the same spawning event and therefore had the same age when measured. We measured snout-vent length to the nearest 0.1 mm with a calliper. We then regressed size on MLH and also on heterozygosity at all loci (multivariate model). When significant, the two models (MLH and multivariate) were compared using a F-test as described in (David 1997; Szulkin et al. 2010) to test whether loci had significantly different effects on growth (test for "local effects"). Statistical analyses were run on Jump 7.0 (SAS Institute Inc.).

To explore correlations between alleles at microsatellite loci and phenotypic traits (here size), we partitioned the second samples of Ruisseau and Fesq into two halves: large and small individuals. We then calculated the  $F_{ST}$  values between large and small groups within the samples (Belkhir et al. 1996). We also used the families reconstructed with Kingroup to test whether mean size differed among the putative families. This was tested with one-way ANOVAs run on Jump 7.0 (SAS Institute Inc.).

To assess the link between heterozygosity and survival, we compared the mean heterozygosity between the first and the second samples in the Ruisseau and Fesq ponds. This is equivalent to test the relationship between HML and survival. To test the effects of individual loci, we constructed a contingency table containing the number of individuals observed in each sample for all combinations (64) of heterozygosities coded as 0 and 1 for the six loci genotyped (e.g. an individual homozygote at all loci was 000000 and a individual heterozygote at all loci 111111). We tested the random distribution of genotypes across the two temporal samples using a Poisson log-linear model (R-Development-Core-Team 2008). In such models, the relative survival of heterozygous versus homozygous individuals at locus

$i$  corresponds to a non-independence between heterozygosity and sample date, and is quantified as an interaction term between the corresponding heterozygosity factor (1 versus 0 at locus  $i$ ) and the sample date (early versus late) (David and Jarne 1997; Manly 1985).

To see if the allelic composition of samples differed between the beginning and the end of the larval development, we also calculated the  $F_{ST}$  values between the first and the second samples in Ruisseau and Fesq populations (Belkhir et al. 1996). We also compared the mean relatedness between the two samples of Ruisseau and Fesq with a permutation test run under R v2.8.1 (R-Development-Core-Team 2008).

A problem with population substructure (eg family structure) is that traditional regression tests for HFC can become too liberal because all individual data points are not independent. To investigate this problem we simulated datasets in which the sample was drawn in a given number of full-sib families; random mating was assumed, parental genotypes were simulated by randomly drawing alleles in the observed sets of allelic frequencies at each locus, and offspring heterozygosities (conditional on parental genotypes) were drawn at random, assuming independence among loci. Phenotypes were also drawn at random, as the sum of  $1/2 h^2 x + (1-1/2 h^2) y$ , where  $x$  is a normal deviate common to all members of a family, and  $y$  is a normal deviate specific to each individual. We assumed that both  $x$  and  $y$  were not correlated to heterozygosity. This allowed us to generate 1000 simulated datasets for each parameter combination (numbers of families, sample sizes,  $h^2$ ); standard regressions of phenotype on heterozygosity were performed on each, and we recorded how often significant tests ( $p < 0.05$ , 0.01 or 0.001) were observed, and compared to the nominal risk (0.05, 0.01, 0.001), i.e. the proportion of significant tests expected by chance if all datapoints had been independent.

### *Laboratory experiment*

We performed quantitative genetic experiments to assess the heritability of larval traits measured in the wild (survival and growth). This was done using a full-sib design in three independent experiments. Controlled rearing experiments were performed in spring 2008, spring 2009 and autumn 2009. For the first experiment on spring cohort, six sites were used: Pataris, Boissière, Claus Bas, Courtpatassière, Peyre Cane and Seuilles. Two other ponds were used in the second experiment: Roubiac and Farlet. In the last experiment, to allow for population comparison, we used the same two ponds (Roubiac and Farlet) and two other ponds (Pataris and Boissière). In each pond, 6 egg masses were collected and quickly brought to the lab where they were allowed to hatch (Amphibian rearing facilities: Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, Montpellier). Within a clutch, most eggs are full-sibs although a few may be half-sibs (different fathers) (Jourdan, H., unpublished genetic data). Therefore we assumed that tadpoles from the same clutch were full-sibs.

After the developing embryos hatched, 10 tadpoles per clutch were reared until metamorphosis in 1-Liter individual plastic boxes with bottom replaced by small-meshed net. Experimental units consisted of 4 plastic tanks (surface: 1m<sup>2</sup>, depth: 10cm) filled with ground water. To limit tank effects, water circulated between tanks. Individual boxes were placed in those big tanks so tadpoles shared the same water. Tadpoles were fed *ad libitum* with rabbit chow (Lapina Finish from DP Nutrition). Water was changed every two weeks to avoid water fouling. Temperature was maintained around 18°C ( $17.8^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ , mean  $\pm$  SEM) in the first experiment and around 20°C in the last two experiments ( $20.27^{\circ}\text{C} \pm 0.24$  in spring 2009 and  $19.99 \pm 0.19$  in autumn 2009). Photoperiod was set at 12/12 L/D.

The length of larval period was considered as the time elapsed from hatching until forelimb protrusion at Gosner stage 42 (Gosner 1960). Tanks were checked every other day and all metamorphs were collected and kept in their boxes with 5mm of water until tail resorption. Survival was assessed at the end of the larval period.



In the first experiment, we also measured the size of individuals at the age of 20 days. Tadpoles were photographed and the images were analysed using the software ImageJ (Abramoff, Magelhaes et al. 2004).

#### *Statistical analyses of lab experiments*

All statistical analyses were performed with R and Jump. (Heritability of larval survival and larval growth (size at 20 days) were measured over 8 populations (4 are replicated on 2 experiments), 5.4 families per population and 9.9 individuals per family) and over 6 populations, 5.3 families per population and 9.6 individuals per family, respectively. The estimation of heritability (broad sense) of survival and size at 20 days and genetic covariance between size at 20 days and larval period required the use of linear mixed models using site and clutch (family) in site as random effects (see Table 2). Larval period was not normally distributed so we did a  $\log(\text{larval period}-20)$  transformation to obtain normal data and run the analysis. Survival at the end of the experiment (i.e metamorphosis) was coded as a binary trait; therefore we estimated the heritability under a threshold model. Briefly, this ANOVA method described by Roff (Roff 1997) estimates the heritability of the underlying trait called liability determining the survival until metamorphosis. Our binary data were analyzed as in a regular analysis of variance. The heritability on the 0/1 scale was then back-transformed into heritability on the underlying scale using formulae given in Roff (Roff 1997). We tested the family effect using mixed effects models with a binomial distribution (package lme4 on R (R-Development-Core-Team 2008)).

## RESULTS

#### *Genetic composition of samples*

Observed and expected heterozygosities and estimated  $F_{IS}$  values are presented in Table 1. Significant heterozygote deficiency occurred in several populations (Fesq, PMP and Bergerie) but at apparently random loci; significant heterozygote excess occurred in Ruisseau for the locus PPU10. Similarly, significant linkage disequilibrium was found at a large proportion of locus pairs; mainly in Ruisseau and Fesq (see Table 2). Little linkage disequilibrium occurred in PMP, Combe l'Escure and Bergerie (between one to three pairs of loci) and none in GMP (Annex B). No sample showed significant evidence of inbreeding based on the  $g_2$  parameter (Table 3) although 6 estimates out of nine are positive; the second sample of the Fesq exhibit the highest  $g_2$  value ( $g_2=0.036 \pm 0.039$ ,  $p=0.098$ ) of all samples.

#### *HFC analyses*

We found no change in heterozygosity between the first and last sample of both Ruisseau and Fesq populations (Table 1  $F_{1,4}=0$ ,  $p=1$  for Ruisseau and  $F_{1,4}=0.84$ ,  $p=0.4$  for Fesq) meaning that there is no correlation between survival and HML. The model allowing for different effects of heterozygosity at all 6 loci on survival was not significant either (log-linear model,  $\chi^2_5= 8.345$ ,  $p=0.14$ ). The relationship between growth (size of tadpoles sampled just before metamorphosis,) and HLM in Ruisseau and Fesq are shown in Figure 1. We found no significant positive correlation in any population (Table 4). Contrary to what we expected, we found a strongly significant negative correlation between size and HML in Fesq population (see Table 4 for statistical values). In this case, both the univariate (MLH) and multivariate (locus-by-locus) models were significant; however the latter did not explain significantly more variance than the former ( $F=0.861$ ,  $p=0.521$ ), indicating no significant differences in heterozygosity effects among loci (see Annex C for details of loci).

#### *Family structure*

Table 5 shows the results of relatedness analyses. We found that the mean pairwise relatedness increased between the two temporal samples taken in each pond but this was not significant. The distribution of relatedness had a large variance. For both Ruisseau and Fesq, the first samples didn't differ from a null distribution ( $p=1$  and  $p=0.08$ ) whereas the second sample did ( $p<0.02$  for both sites) (Fig2 and Table 5). These analyses suggest that our samples were composed of a limited number of families, especially in Fesq (method 1/a, Table 5). The estimation of the number of families within a sample varied with the method used but the pattern remained: there were a limited number of families in a larval cohort (Table 5).

#### *Theoretical Effect of family structure on HFC tests*

Our simulations showed that the proportion of false positives (type II error) was, as expected, higher than nominal  $p$ -values, when the sample was structured into a small number of families. However, with realistic values ( $h^2=0.5$ , see below; 5 or 10 families in the sample) the ratio between true and nominal  $p$ -values remains modest (Table 6). We conclude that  $p$ -values of less than 0.001 (such as that observed in the Fesq population) are very unlikely to emerge by chance under realistic levels of family structure.

#### *AFC and heritability of fitness traits*

Genotype-dependent survival was apparent in the two sites (in Ruisseau,  $F_{ST}$  between temporal samples=0.005,  $p=0.026$  and in Fesq,  $F_{ST}=0.015$ ,  $p=0.034$ ). The number of estimated families apparently decreased between successive samples in both populations (Table 5). Reconstructed families (using “Modified Simpson” method, Fig. 3) were not equally represented between the two samples for Ruisseau ( $\chi^2_{13}=56.265$ ,  $p=0.007$ ) although this was not significant in the Fesq pond ( $\chi^2_{33}=17.924$ ,  $p=0.16$ ). Differential survival between

families was also observed in quantitative genetic experiments. We calculated the broad sense heritability of survival in lab conditions and found a significant heritability of  $0.158 \pm 0.055$  ( $p < 0.001$ ).

We calculated the genetic differentiation between the two size classes (large and small) in Ruisseau and Fesq and found that it was significant (in Ruisseau,  $F_{ST}=0.012$   $p=0.011$  and in Fesq,  $F_{ST}=0.058$   $p=0.007$ ). Using reconstructed families (given by “Modified Simpson” method in Kingroup), we estimated the effect of family on size in the second sample of Ruisseau and Fesq pond and found a significant effect in Fesq but not in Ruisseau (Table 7). The family effect in Fesq is consistent with a very high heritability ( $0.96 \pm 0.36$ ,  $p=0.0054$ ) although this estimate is very imprecise (low sample size and uncertain family reconstruction). However, the heritability of size in the laboratory, in which family reconstruction is not an issue, is also on average very high and significant ( $0.412 \pm 0.123$ ,  $p < 0.0001$ ). When estimating this heritability for each site separately, we found contrasted values from non significant to a heritability of 1 (Seuilles:  $H^2= 0.07 \pm 0.17$ ,  $p=0.64$  ; Pataris:  $H^2=0.15 \pm 0.21$ ,  $p=0.44$  ; Courtpatassiere:  $H^2= 0.18 \pm 0.22$ ,  $p=0.26$  ; Claus:  $H^2=0.32 \pm 0.37$ ,  $p=0.13$  ; Boissiere:  $H^2=0.76 \pm 0.37$ ,  $p=0.0006$  ; Peyre:  $H^2=1 \pm 0.47$ ,  $p=0.0002$ ).

## DISCUSSION

### *Inbreeding and relatedness within populations*

HFC depends on the existence of heterogeneity in inbreeding within the considered population, which should generate heterozygote deficiencies, correlations in heterozygosity among loci or both. We found few such indications of inbreeding within tadpole cohorts. Some  $F_{IS}$  values were significant in some populations; however this was not consistent among loci as one would expect for heterozygote deficiencies generated by inbreeding. The  $g_2$

estimates (correlations in heterozygosity among loci) also showed little evidence of inbreeding. However the power of this test is reduced due to low sample size, and most  $g^2$  values are positive, so we cannot exclude that some of the populations have a low proportion of slightly inbred individuals (e.g. Fesq and Bergerie).

However, significant linkage disequilibrium is found between various loci in many populations; this indicates genetic heterogeneity within cohorts and is consistent with a family structure. This is also consistent with the sporadic repartition of significant positive and negative  $F_{IS}$  values, which is expected when samples consist of random mixes of a few differentiated subgroups. Our field data on the same sites indicate that the entire larval cohorts were generated by a limited number of breeding pairs in each site. In the field, we counted a total of 43 egg masses in Ruisseau before we collected the larval sample and only nine in Fesq. A similar or smaller number of families is expected in the genetic samples. Indeed, it is possible that several egg masses are laid by a single pair of parsley frogs, decreasing even more the actual number of families compared to the egg mass counts. Multipaternity has never been demonstrated in parsley frog but has been shown in other amphibian species (Laurila and Seppa 1998; Lode et al. 2005; Lode and Lesbarreres 2004; Myers and Zamudio 2004). The existence of limited number of families was further confirmed by analyses based on relatedness. Estimates of the number of families based on the distribution of pairwise relatedness or on clustering algorithms were nevertheless higher than the number of egg masses observed in the field, although they are in the same order of magnitude, and the large difference between the two populations (Ruisseau and Fesq) is maintained. The discrepancy between genetic and observational methods may be due to the large variance and thus potential error in relatedness estimates as observed in many other studies (Csillery et al. 2006; Russello and Amato 2004; Van Horn et al. 2008). Relatedness values require a very high number of genetic markers to give proper estimates of kin structure (Blouin 2003).

It appears that in small fragmented population of parsley frog, inbreeding is not a major concern but larval cohorts are founded by only a few pairs of breeders. This generates a potentially high genetic heterogeneity if family differs in heterozygosity or even genotypes.

#### *Family structure and relationship between phenotypes and genotypes*

Our samples are composed by a set of families therefore we looked for differences between families, namely heritability, for larval traits. This was done in controlled conditions and we found that survival and larval growth had a high heritability, *sensu lato*. We are aware that maternal effects can be very high in amphibian and this is likely to increase our estimates of heritability (Laugen et al. 2002; Rasanen et al. 2003b). Since families differ in their phenotypic values, conditions are met to find relationships between neutral genetic markers and traits. First, if families differ by inbreeding values, HFC are expected. Second, relationships between allelic compositions and fitness (AFC) may arise. These effects should become stronger when the number of families in the sample decreases (in our case, in the Fesq, compared to the Ruisseau, population).

A simple way to test AFC is  $F_{ST}$  values. We found significant  $F_{ST}$  between the two temporal samples of Ruisseau and Fesq ponds, suggesting that genotypes, or families (carrying different sets of alleles), are not represented equally in the early and late samples, i.e differential survival. This hypothesis is consistent with the decrease of estimated number of families between the two temporal samples in each site. We also found a significant change in family distribution over time in the Ruisseau samples but not in Fesq. Although the number of families is lower in Fesq (inducing three times higher  $F_{ST}$ ), the small sample size limit our statistical power to test the difference between family distribution. This change is less visible ( $F_{ST}$ , although significant, is three times smaller and differences in family distribution are not significant) in Ruisseau. Although associations between molecular genotypes and fitness

often focus on heterozygosity only, differential survival of individuals with different electrophoretic genotypes have already been observed. For example, in *Bufo boreas*, Samollow (1980) showed differential mortality of tadpoles associated with electrophoretic variation (other than heterozygosity). Given the similarity in reproductive biology between these two amphibian species, it is possible that such correlations relied on differential survival of a limited number of families as in the parsley frog.

Similar AFC's are observed using growth rates. Growth (or size) is highly heritable in lab experiments. This resulted in significant  $F_{ST}$  values between groups of bigger and smaller larvae in the second sample of Ruisseau and Fesq ponds, as well as differences in growth among putative families reconstructed from microsatellite genotypes in the Fesq population. Again, the pattern is stronger in the population with fewer families (Fesq) as expected.

We did not expect strong HFC to occur in the studied populations because we did not observe evidences for inbreeding (except, perhaps, in the Fesq population). Indeed, we found no correlation between heterozygosity and survival, and even using the larger dataset on growth no HFC was found in five ponds over six. Surprisingly, a significant negative HFC was found in Fesq. In this case, there is no evidence that the observed effect is due to one locus in particular (local effects). Two hypotheses are left to explain the correlation (i) a type one error, as the significance is inflated by family structure or (ii) some form of reverse HFC, by which outbred individuals would be relatively unfit compared to inbred ones, i.e. outbreeding depression.

Type one errors are inflated under three conditions: 1) few genotyped loci generating large contrasts in MLH among families by chance, even in the absence of inbreeding, 2) highly structured sample with very few families compared to the sample size, 3) high heritability resulting in highly differentiated phenotypic values among families. In our case, even using the most pessimistic assumptions on growth heritability (very high) and family

number (very few), we found that the observed p-value ( $2.5 \times 10^{-6}$ ) can very improbably be obtained by chance, even allowing for an additional Bonferroni correction over the 6 populations studied. Therefore the observed correlation has to be interpreted as truly significant, i.e. more heterozygous individuals or families grew less in the Fesq tadpole cohort.

Outbreeding depression expresses the fact that relatively outbred offspring have lower relative fitness than relatively inbred individuals, sometimes their own parents (Lynch and Walsh 1998). Two mechanisms can explain this phenomenon. The first is intrinsic incompatibilities: offspring of genetically distant mates may suffer from the break-up of the coadapted genome of the parents. The second is local adaptation, hybrid offspring may be less adapted to either of the local environments than either parent is to its own environment (Waldman and McKinnon 1993). Both explanations could apply in our case. Previous analyses of the population structure of *Pelodytes punctatus* have shown local differentiation ( $F_{ST}=0.1$  on average, Jourdan-Pineau et al. 2010b, submitted) among tadpole populations, which tend to be maintained from one breeding season to the next. This indicates that all sites are relatively isolated from one another. In such contexts, it has been shown that outbreeding depression can occur even between geographically close populations (Dudash and Fenster 2000; Edmands 1999; Fenster and Galloway 2000). For example, in the same system of ponds as we studied, outbreeding depression has been observed for some traits in a snail species, *Physa acuta* (Escobar et al. 2008), using controlled crosses. The same process is also plausible in amphibians. Unfortunately, although local adaptation (which can be one source of outbreeding depression) has been well described in amphibians (e.g. Berven 1982; Laugen et al. 2003; Rasanen et al. 2003a), outbreeding depression itself has rarely been assessed except between two populations of common frog, *Rana temporaria* (Sagvik et al. 2005).



## CONCLUSION

Fragmented populations are likely to show some level of inbreeding due to small population size, internal genetic structure or population bottlenecks and this can generate positive HFC (Bierne et al. 2000a; Bierne et al. 2000b; Ohta 1971; Szulkin et al. 2010). However, we identified two additional, previously overlooked, processes that may add complexity to the patterns of correlations between molecular genotypes and phenotypes in such populations. First, small size of breeding groups may result in genetic heterogeneity within demes due to family structure, especially in species that breed in pairs that can produce large number of offspring. The consequences of this heterogeneity are twofold. It artificially inflates significance of HFC tests and also creates associations between alleles and fitness (AFC), independent of heterozygosity *per se*. Second, although small, isolated populations tend to accumulate deleterious recessive alleles, they also accumulate genetic incompatibilities and/or local adaptation alleles in such a way that outbreeding depression can emerge when migrant individuals happen to enter in a new deme. In such situations negative rather than positive HFC can be observed. Note that both positive and negative HFC can be observed on different characters at the same time, as it has been shown that outbreeding depression and heterosis can be observed simultaneously in interpopulation crosses, on different traits (Escobar et al. 2008). AFC and negative HFC are probably more frequent than they are usually thought to be, although they are often neglected (or explained using *ad hoc* locus-specific effects, (Charpentier et al. 2008; Hansson et al. 2004; Lieutenant-Gosselin and Bernatchez 2006)). Yet family structure and outbreeding depression are plausible explanations because both of them are actually observed in many natural and experimental contexts. Future studies of genotype-phenotype relationships, in fragmented populations, especially HFC studies should seriously take them into account.

## REFERENCES

- Altwegg, R., and H. U. Reyer. 2003. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution* 57:872-882.
- Andersen, L. W., K. Fog, and C. Damgaard. 2004. Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271:1293-1302.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, and F. Bonhomme. 1996. GENETIX 4.02 logiciel sous Windows<sup>TM</sup> pour la génétique des populations.
- Berven, K. A. 1982. The genetic basis of altitudinal variation in the wood frog *Rana sylvatica* II. An experimental analysis of larval development. *Oecologia* 52:360-369.
- Bierne, N., I. Bezuart, V. Vonau, F. Bonhomme, E. Bedier, and Aquacop. 2000a. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 184:203-219.
- Bierne, N., A. Tsitrone, and P. David. 2000b. An inbreeding model of associative overdominance during a population bottleneck. *Genetics* 155:1981-1990.
- Blomqvist, D., A. Pauliny, M. Larsson, and L. A. Flodin. 2010. Trapped in the extinction vortex? Strong genetic effects in a declining vertebrate population. *Bmc Evolutionary Biology* 10:-.
- Blouin, M. S. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends In Ecology & Evolution* 18:503-511.
- Britten, H. B. 1996. Meta-analyses of the association between multilocus heterozygosity and fitness. *Evolution* 50:2158-2164.
- Chapman, J. R., S. Nakagawa, D. W. Coltman, J. Slate, and B. C. Sheldon. 2009. A quantitative review of heterozygosity-fitness correlations in animal populations. *Molecular Ecology* 18:2746-2765.

- Charpentier, M. J. E., F. Prugnolle, O. Gimenez, and A. Widdig. 2008. Genetic heterozygosity and sociality in a primate species. *Behavior Genetics* 38:151-158.
- Csillery, K., T. Johnson, D. Beraldi, T. Clutton-Brock, D. Coltman, B. Hansson, G. Spong, and J. M. Pemberton. 2006. Performance of marker-based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates. *Genetics* 173:2091-2101.
- Cushman, S. A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation* 128:231-240.
- David, P. 1997. Modeling the genetic basis of heterosis: Tests of alternative hypotheses. *Evolution* 51:1049-1057.
- David, P., and P. Jarne. 1997. Context-dependent survival differences among electrophoretic genotypes in natural populations of the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Genetics* 146:335-344.
- David, P., B. Pujol, F. Viard, V. Castella, and J. Goudet. 2007. Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology* 16:2474-2487.
- Dixo, M., J. P. Metzger, J. S. Morgante, and K. R. Zamudio. 2009. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biological Conservation* 142:1560-1569.
- Dudash, M. R., and C. B. Fenster. 2000. Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations *in* A. G. Young and G. M. Clarke, eds. *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Edmands, S. 1999. Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a wide range of divergence. *Evolution* 53:1757-1768.
- Escobar, J. S., A. Nicot, and P. David. 2008. The Different Sources of Variation in Inbreeding Depression, Heterosis and Outbreeding Depression in a Metapopulation of *Physa acuta*. *Genetics* 180:1593-1608.

- Fenster, C. B., and L. F. Galloway. 2000. Inbreeding and outbreeding depression in natural populations of *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). *Conservation Biology* 14:1406-1412.
- Goodnight, K. F., and D. C. Queller. 1999. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology* 8:1231-1234.
- Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183-190.
- Guyétant, R., W. Temmermans, and J. N. Avriillier. 1999. Phenology of the reproduction of *Pelodytes punctatus* Daudin, 1802 (Amphibia, Anura). *Amphibia-Reptilia* 20:149-160.
- Halverson, M. A., D. K. Skelly, and A. Caccone. 2006. Inbreeding linked to amphibian survival in the wild but not in the laboratory. *Journal of Heredity* 97:499-507.
- Hansson, B., H. Westerdahl, D. Hasselquist, M. Akesson, and S. Bensch. 2004. Does Linkage Disequilibrium Generate Heterozygosity-Fitness Correlations in Great Reed Warblers? *Evolution* 58:870-879.
- Jaquier, J., F. Guillaume, and N. Perrin. 2009. Predicting the Deleterious Effects of Mutation Load in Fragmented Populations. *Conservation Biology* 23:207-218.
- Jourdan-Pineau, H., P. A. Crochet, R. A. Relyea, and P. David. 2010a. Autumn or spring spawning: impact of breeding phenology on larval fitness in Parsley frog, *Pelodytes punctatus*. in prep
- Jourdan-Pineau, H., P. David, and P. A. Crochet. 2010b. Plastic rather than genetic differences between seasonal breeding cohorts in Mediterranean Parsley frog, *Pelodytes punctatus*. submitted
- Jourdan-Pineau, H., P. David, and P. A. Crochet. 2010c. Temporal and spatial niche partitioning: Parsley frog, *Pelodytes punctatus*, can't win on both counts. in prep

- Jourdan-Pineau, H., A. Nicot, V. Dupuy, P. David, and P. A. Crochet. 2009. Development of eight microsatellite markers in the parsley frog (*Pelodytes punctatus*). *Molecular Ecology Resources* 9:261-263.
- Konovalov, D. A., N. Bajema, and B. Litow. 2005. Modified SIMPSON  $O(n^3)$  algorithm for the full sibship reconstruction problem. *Bioinformatics* 21:3912-3917.
- Laugen, A. T., A. Laurila, and J. Merila. 2002. Maternal and genetic contributions to geographical variation in *Rana temporaria* larval life-history traits. *Biological Journal of the Linnean Society* 76:61-70.
- Laugen, A. T., A. Laurila, K. Rasanen, and J. Merila. 2003. Latitudinal countergradient variation in the common frog (*Rana temporaria*) development rates - evidence for local adaptation. *Journal of Evolutionary Biology* 16:996-1005.
- Laurila, A., and P. Seppa. 1998. Multiple paternity in the common frog (*Rana temporaria*): genetic evidence from tadpole kin groups. *Biological Journal of the Linnean Society* 63:221-232.
- Lesbarreres, D., A. Pagano, and T. Lode. 2003. Inbreeding and road effect zone in a Ranidae: the case of Agile frog, *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840. *Comptes Rendus Biologies* 326:S68-S72.
- Lesbarreres, D., D. S. Schmeller, C. R. Primmer, and J. Merila. 2007. Genetic variability predicts common frog (*Rana temporaria*) size at metamorphosis in the wild. *Heredity* 99:41-46.
- Lieutenant-Gosselin, M., and L. Bernatchez. 2006. Local heterozygosity-fitness correlations with global positive effects on fitness in threespine stickleback. *Evolution* 60:1658-1668.

- Lode, T., M. J. Holveck, and D. Lesbarreres. 2005. Asynchronous arrival pattern, operational sex ratio and occurrence of multiple paternities in a territorial breeding anuran, *Rana dalmatina*. *Biological Journal of the Linnean Society* 86:191-200.
- Lode, T., and D. Lesbarreres. 2004. Multiple paternity in *Rana dalmatina*, a monogamous territorial breeding anuran. *Naturwissenschaften* 91:44-47.
- Lynch, M., and B. Walsh. 1998. *Genetics and analysis of quantitative traits*, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Manly, B. F. J. 1985. *The Statistics of Natural Selection on Animal Populations*. Chapman and Hall, London.
- Myers, E. M., and K. R. Zamudio. 2004. Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian: the effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. *Molecular Ecology* 13:1951-1963.
- Ohta, T. 1971. Associative Overdominance Caused by Linked Detrimental Mutations. *Genetical Research* 18:277-&.
- Oigarden, T., T. Borge, and J. T. Lifjeld. 2010. Extrapair paternity and genetic diversity: the white-throated dipper *Cinclus cinclus*. *Journal of Avian Biology* 41:248-257.
- Queller, D. C., and K. F. Goodnight. 1989. Estimating Relatedness Using Genetic-Markers. *Evolution* 43:258-275.
- R-Development-Core-Team. 2008. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rasanen, K., A. Laurila, and J. Merila. 2003a. Geographic variation in acid stress tolerance of the moor frog, *Rana arvalis*. I. Local adaptation. *Evolution* 57:352-362.
- Rasanen, K., A. Laurila, and J. Merila. 2003b. Geographic variation in acid stress tolerance of the moor frog, *Rana arvalis*. II. Adaptive maternal effects. *Evolution* 57:363-371.

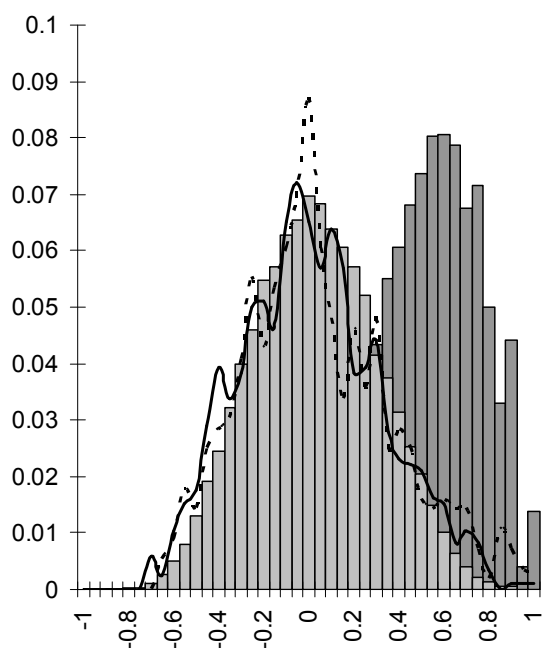
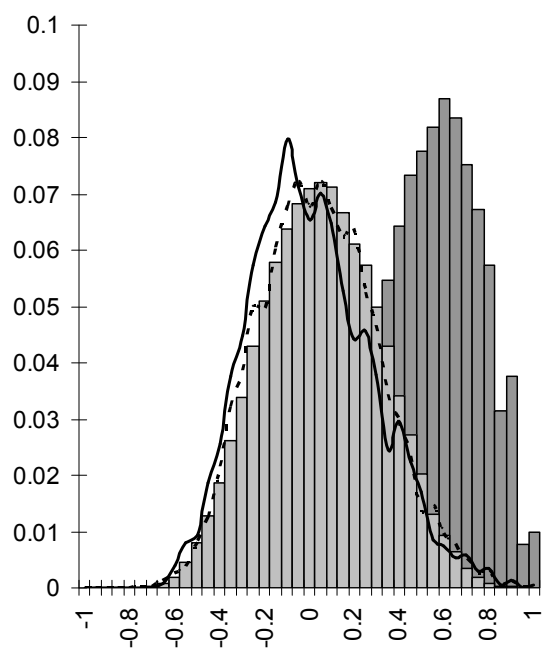
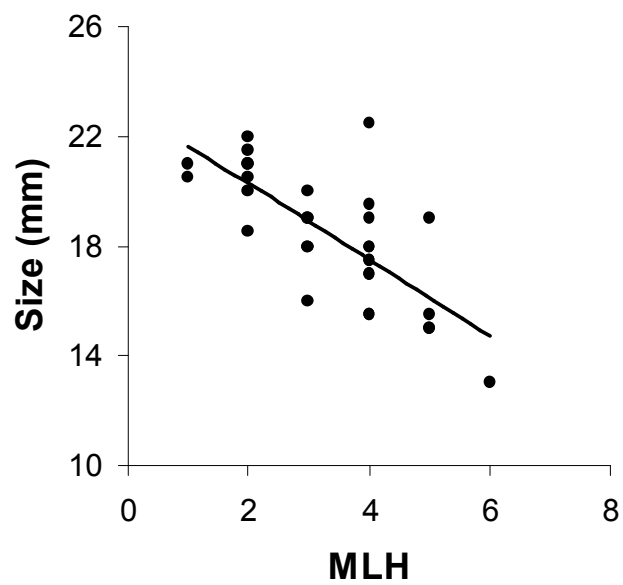
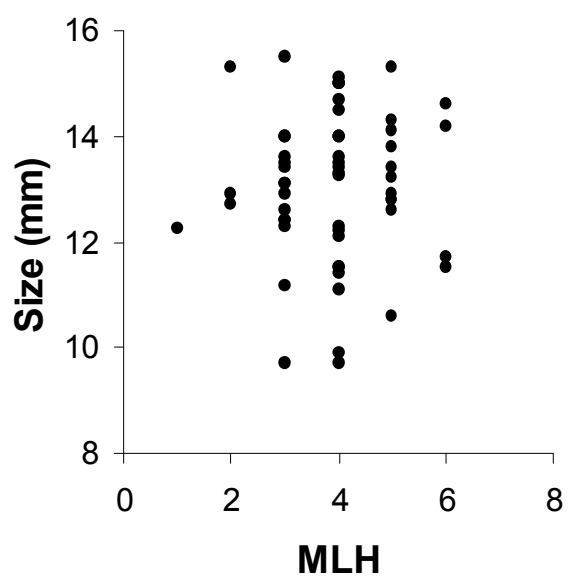
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995. Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249.
- Reid, J. M., and L. F. Keller. 2010. Correlated Inbreeding among Relatives: Occurrence, Magnitude, and Implications. *Evolution* 64:973-985.
- Richter-Boix, A., G. A. Llorente, and A. Montori. 2006. Breeding phenology of an amphibian community in a Mediterranean area. *Amphibia-Reptilia* 27:549-559.
- Roff, D. A. 1997. *Evolutionary Quantitative Genetics*. Chapman and Hall, New York.
- Rousset, F. 2008. GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103-106.
- Russello, M. A., and G. Amato. 2004. Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology* 13:2829-2840.
- Sagvik, J., T. Uller, and M. Olsson. 2005. Outbreeding depression in the common frog, *Rana temporaria*. *Conservation Genetics* 6:205-211.
- Samollow, P. B. 1980. Selective Mortality and Reproduction in a Natural-Population of *Bufo-Boreas*. *Evolution* 34:18-39.
- Schmeller, D. S., J. Schregel, and M. Veith. 2007. The importance of heterozygosity in a frog's life. *Naturwissenschaften* 94:360-366.
- Smith, D. C. 1987. Adult Recruitment in Chorus Frogs - Effects of Size and Date at Metamorphosis. *Ecology* 68:344-350.
- Szulkin, M., N. Bierne, and P. David. 2010. Heterozygosity-Fitness Correlations: A Time for Reappraisal. *Evolution* 64:1202-1217.
- Van Horn, R. C., J. Altmann, and S. C. Alberts. 2008. Can't get there from here: inferring kinship from pairwise genetic relatedness. *Animal Behaviour* 75:1173-1180.

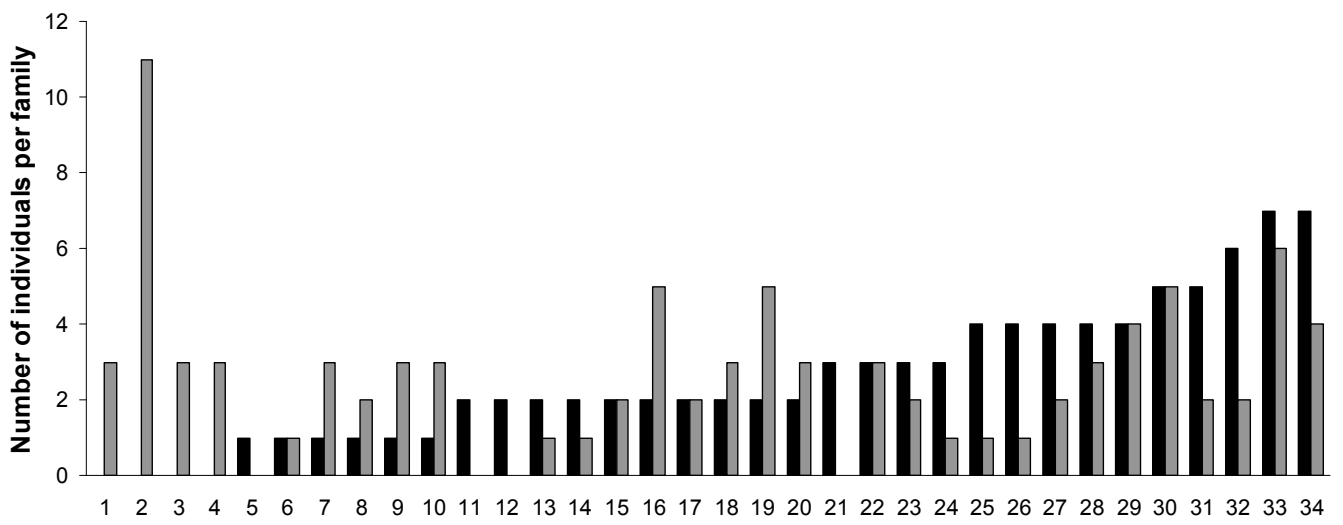
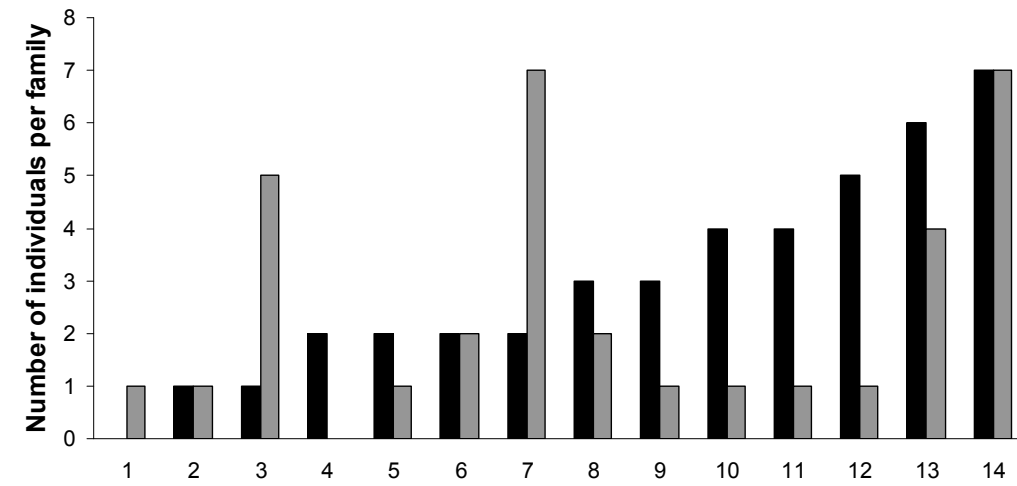
- Waldman, B., and J. S. McKinnon. 1993. Inbreeding and outbreeding in Fishes, Amphibians and Reptiles *in* N. W. Tornhill, ed. The natural history of inbreeding and outbreeding: theoretical and empirical perspectives. . University of Chicago Press, Chicago.
- Weir, B. S., and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution* 38:1358-1370.

#### FIGURE LEGENDS:

- Figure 1: Size (snout-vent length) measured on individuals taken in the second sample in Ruisseau (A) et Fesq (B) ponds in relation to multi-locus heterozygosity (MLH).
- Figure 2: Distributions of pairwise relatedness (black lines) in the first (solid lines) and second (dashed lines) sample of the Ruisseau (left panel) and Fesq (right panel) ponds. Histograms represent the expected distribution of pairwise relatedness of a population of non-related individuals (light grey) and in random full-sib pairs (dark grey). Note that relatedness estimates can be negative because they are unbiased by construction, so that when the true relatedness is zero, negative and positive estimates are equally likely.
- Figure 3: Number of individuals assigned to each putative family reconstructed with Kingroup (Modified Simpson) in the first (black) or second sample (grey) of Fesq (A) and Ruisseau (B) ponds.







site	Ruisseau (n(start)=88, n(end)=90)						Fesq(n(start)=42, n(end)=34)					
	He			Hobs			He			Hobs		
	Start	End	F <sub>IS</sub>	Start	End	F <sub>IS</sub>	Start	End	F <sub>IS</sub>	Start	End	F <sub>IS</sub>
loci												
PPU2	0.774	0.786	0.796	0.767	0.767	-0.023	0.030	0.756	0.638	0.738	0.618	0.035
PPU5	0.666	0.650	0.693	0.711	0.711	-0.035	-0.089	0.631	0.702	0.571	0.794	0.107
PPU10	0.685	0.734	0.761	0.811	0.811	-0.107	<b>-0.100</b>	0.670	0.660	0.643	0.559	0.053
PPU11	0.392	0.333	0.352	0.311	0.311	0.106	0.072	0.486	0.500	0.357	0.294	<b>0.276</b>
PPU15	0.566	0.476	0.625	0.444	0.444	-0.098	0.072	0.411	0.319	0.286	0.206	<b>0.315</b>
PPU16	0.868	0.838	0.875	0.867	0.867	-0.002	-0.029	0.774	0.764	0.714	0.853	0.090
All	0.658	0.636	0.684	0.652	0.652	-0.033	-0.019	0.621	0.597	0.552	0.554	<b>0.124</b>
												<b>0.087</b>
site	PMP (n=31)						Combe l'Escurie(n=31)					
	He			Hobs			He			Hobs		
	Start	End	F <sub>IS</sub>	Start	End	F <sub>IS</sub>	Start	End	F <sub>IS</sub>	Start	End	F <sub>IS</sub>
loci												
PPU2	0.752	0.548	<b>0.286</b>	0.643	0.643	0.677	-0.037	0.664	0.677	-0.003	0.661	0.688
PPU5	0.609	0.742	<b>-0.203</b>	0.643	0.643	0.613	0.063	0.512	0.452	0.134	0.577	0.656
PPU10	0.612	0.613	0.016	0.630	0.630	0.677	-0.059	0.624	0.742	-0.172	0.517	0.375
PPU11	0.433	0.300	<b>0.322</b>	0.498	0.498	0.400	0.213	0.448	0.290	<b>0.366</b>	0.359	0.219
PPU15	0.200	0.226	-0.111	0.307	0.307	0.290	0.069	0.225	0.194	0.155	0.398	0.500
PPU16	0.877	0.807	<b>0.096</b>	0.858	0.858	0.871	0.001	0.856	0.839	0.037	0.807	0.688
All	0.581	0.539	<b>0.088</b>	0.596	0.596	0.588	0.030	0.555	0.532	0.057	0.553	0.521
												<b>0.074</b>

Table 1: expected and observed heterozygosity (He and Hobs, respectively) and heterozygote deficiency (F<sub>IS</sub>) for all samples, at all genotyped loci. Significant values (p<0.05) of F<sub>IS</sub> are bold numbers. "Start" and "end" refer to the two temporal samples in the Ruisseau and Fesq ponds. We limited sample sizes so that they never represent a large (>10%) part of the initial population.

		PPU5	PPU10	PPU11	PPU15	PPU16
Ruisseau Start	PPU2	0.140	<b>0.000</b>	0.055	0.120	<b>0.022</b>
	PPU5		<b>0.000</b>	0.357	0.297	<b>0.000</b>
	PPU10			0.165	<b>0.023</b>	<b>0.013</b>
	PPU11				0.354	<b>0.000</b>
	PPU15					<b>0.028</b>
Ruisseau End	PPU2	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.329	<b>0.004</b>	<b>0.000</b>
	PPU5		<b>0.005</b>	0.469	0.137	<b>0.019</b>
	PPU10			<b>0.005</b>	<b>0.042</b>	0.089
	PPU11				0.049	<b>0.002</b>
	PPU15					<b>0.005</b>
Fesq Start	PPU2	<b>0.003</b>	<b>0.033</b>	0.229	<b>0.003</b>	<b>0.043</b>
	PPU5		<b>0.033</b>	0.419	0.015	<b>0.000</b>
	PPU10			0.115	<b>0.002</b>	0.057
	PPU11				0.092	0.531
	PPU15					<b>0.020</b>
Fesq End	PPU2	<b>0.012</b>	<b>0.005</b>	0.157	0.910	0.094
	PPU5		<b>0.000</b>	0.091	0.391	0.146
	PPU10			<b>0.010</b>	0.968	0.366
	PPU11				0.201	0.499
	PPU15					<b>0.004</b>

Table 2: Linkage disequilibrium between loci in each sample of Ruisseau and Fesq (p values, bold if <0.05)

site	g <sub>2</sub>	sd	p value
Ruisseau start	0.008	0.013	0.193
Ruisseau end	-0.005	0.012	0.611
Fesq start	0.017	0.033	0.239
Fesq end	0.036	0.039	0.098
PMP	-0.058	0.036	0.943
GMP	0.019	0.034	0.208
Combe l'Escure	0.012	0.037	0.275
Bergerie	0.031	0.046	0.189

Table 3: Estimates of inbreeding using the g<sub>2</sub> parameter in each genotyped sample.

Site	Model	N	slope	R <sup>2</sup>	p value	test of loci/loci against MLH			
						res SS	df	F	p value
Ruisseau	HML	92	0.043	0.001	0.900	244.418	90	1.335	0.258
	loci/loci			0.073	0.887	226.627	85		
Fesq	HML	31	-1.379	<b>0.540</b>	<b>&lt;0.001</b>	76.179	29	0.861	0.521
	loci/loci			<b>0.610</b>	<b>0.001</b>	64.587	24		
Bergerie	HML	32	-0.070	0.010	0.578	25.698	30	0.844	0.532
	loci/loci			0.153	0.612	21.987	25		
Combe l'Escure	HML	31	0.080	0.018	0.472	13.495	29	1.210	0.335
	loci/loci			0.216	0.391	10.779	24		
GMP	HML	28	-0.147	0.051	0.248	13.932	26	0.110	0.989
	loci/loci			0.075	0.938	13.575	21		
PMP	HML	30	0.171	0.038	0.304	24.410	28	1.160	0.358
	loci/loci			0.231	0.646	19.494	23		

Table 4: Relationship between size and heterozygosity (HML or multivariate model comprising the effect of each locus separately, indicated as “loci/loci” in the table) in each population sampled. For Ruisseau and Fesq, we used the second sample.

	Ruisseau		Fesq	
	Start	End	Start	End
R	-0.0192	0.0165	-0.0156	0.0138
$SD(R)$	0.27	0.25	0.31	0.33
Nb of families:				
1/a	103	73	26	11
MCS		83		22
MS		34		14
Visual count of egg masses		43		9

Table 5 : Mean pairwise relatedness, R (Queller and Goodnight 1989) and number of families estimated in the first and the second sample taken in Ruisseau and Fesq ponds. Permutation test of R between samples within sites showed no significant difference (Ruisseau,  $p=0.33$ ; Fesq,  $p=0.13$ ). The estimation of family number relies on several methods:  $1/a$  ( $a$ =proportion of full-sibs) “Markov Chain Simpson” (MCS) and “Modified Simpson” (MS) (partition of sample into sibships) and finally visual count of egg masses based on field survey.

$h^2$	N families	N indiv / family	proportion of false positives			
			$p=0.05$	$p=0.01$	$p=0.005$	$p=0.001$
0.5	10	5	0.065	0.0158	0.0078	0.0016
	5	10	0.0744	0.0199	0.0107	0.0019
1	10	5	0.1183	0.0399	0.0254	0.0076
	5	10	0.1773	0.0744	0.0516	0.0221

Table 6: Effect of family structure on regression tests. We simulated heterozygosity-phenotype regressions with specified family structures in the sample (50 individuals divided in 5 or 10 equally represented families) under the null hypothesis, and computed the proportion of significant tests (false positives) for various thresholds ( $p=0.05$  to  $0.001$ ). Results are given for two values of trait heritability. The simulations used observed allele frequencies from the Fesq population, and assume random mating with monogamy.

Family effect on size	residual df	Residual Sum of Sq	Family df	Family Sum of Square	F ratio	p-value
Ruisseau	59	148.486	30	84.385	1.1177	0.35
Fesq	21	62.742	9	102.968	3.829	0.005

Table 7: Analyses of the family effect on size in Ruisseau and Fesq pond, using reconstructed families (Kingroup, “Modified Simpson”)

Pond name	Use	Latitude	Longitude
Bergerie	G	43.5803	3.7019
Boissière	E	43.8337	3.7461
Courtpatassière	E	43.5603	3.6686
Escure	G	43.5733	3.6994
Farlet	E	43.4908	3.7415
Fesq	G	43.8028	3.7919
GMP	G	43.7708	3.7945
Pataris	E	43.5694	3.6951
Peyre	E	43.7622	3.7247
PMP	G	43.7708	3.7950
Roubiac	E	43.7597	3.7879
Ruisseau	G	43.5714	3.6973
Sueuilles	E	43.7597	3.7772

Annex A: Use (G for genotyping and E for experimental rearing) and geographical localization for each studied site.

		PPU5	PPU10	PPU11	PPU15	PPU16
PMP	PPU2	0.734	<b>0.009</b>	0.466	0.610	0.064
	PPU5		0.903	0.118	0.219	0.206
	PPU10			0.537	0.410	0.100
	PPU11				0.951	0.888
	PPU15					0.441
GMP	PPU2	0.070	0.305	0.945	0.995	0.082
	PPU5		0.083	0.524	0.579	0.281
	PPU10			0.414	0.397	0.251
	PPU11				0.677	0.390
	PPU15					0.291
Escure	PPU2	0.247	0.213	0.967	0.552	0.443
	PPU5		0.386	0.614	0.212	0.298
	PPU10			0.079	0.502	0.608
	PPU11				0.520	<b>0.011</b>
	PPU15					0.131
Bergerie	PPU2	0.230	0.142	<b>0.002</b>	<b>0.007</b>	0.086
	PPU5		0.064	0.559	0.139	0.079
	PPU10			0.483	0.688	<b>0.026</b>
	PPU11				0.178	0.394
	PPU15					0.056

Annex B: Linkage disequilibrium between loci in PMP, GMP, Escure and Bergerie (p values, bold if <0.05)

locus	slope	pvalue
PPU2	-0.108	0.899
PPU5	-1.309	0.089
PPU10	-2.908	0.002
PPU11	-0.411	0.573
PPU15	-1.723	0.037
PPU16	-0.596	0.529

Annex B: Relationship between size and heterozygosity for each genotyped locus in the Fesq pond, second sample.





## Chapitre 7

---

# Conclusion

## 7.1 Apports de cette thèse

### 7.1.1 Connaissance du Pélodyte

Je me suis amusée à relire le sujet de thèse défini au départ par Patrice et Pierre-André. Les résultats attendus étaient nombreux : 1) quantifier les paramètres de métapopulation (effectifs efficaces, système de reproduction, dispersion), 2) déterminer si les différentes périodes de reproduction correspondent à des stratégies fixées pour chaque individu ou à des réponses opportunistes aux variations environnementales, 3) évaluer la contribution relative des pontes d'automne et de printemps dans la production de juvéniles et étudier les différences de traits larvaires entre les cohortes 4) estimer la survie juvénile.

J'étais agréablement surprise de découvrir que j'avais peu dévié du sujet et que la majorité des objectifs étaient atteints. Détaillons rapidement.

Le Pélodyte se reproduit bien à la fois en automne et au printemps et la patron observé est également confirmé par l'analyse de la base de données Languedoc-Roussillon mise au point par Philippe Geniez et Marc Cheylan (Figure 7.1 et Figure 7.2). Nous montrons, de plus, que le Pélodyte produit plus d'œufs en automne et du coup plus de juvéniles. Donc la reproduction d'automne n'est pas juste une bizarrerie mais réellement une stratégie efficace. Cependant, de façon générale, le Pélodyte (comme beaucoup d'amphibiens) se reproduit presque pour rien. Le taux de production de juvéniles à partir d'œufs est de l'ordre de quelques pourcents.

Cette grande variation dans la survie s'ajoute à une large variation dans le nombre de pontes produites lors d'un événement de reproduction. En effet, les sites utilisés pour la reproduction varient énormément en taille, donc en nombre de reproducteurs présents et finalement en nombre d'œufs pondus. Ceci complique énormément l'analyse des variations d'efforts de ponte et de survie larvaire : beaucoup de bruits au milieu desquels on cherche des effets potentiellement faibles. Il faudrait sans doute travailler sur des sites beaucoup plus similaires pour réduire un peu ce problème (mais les sites choisis étaient

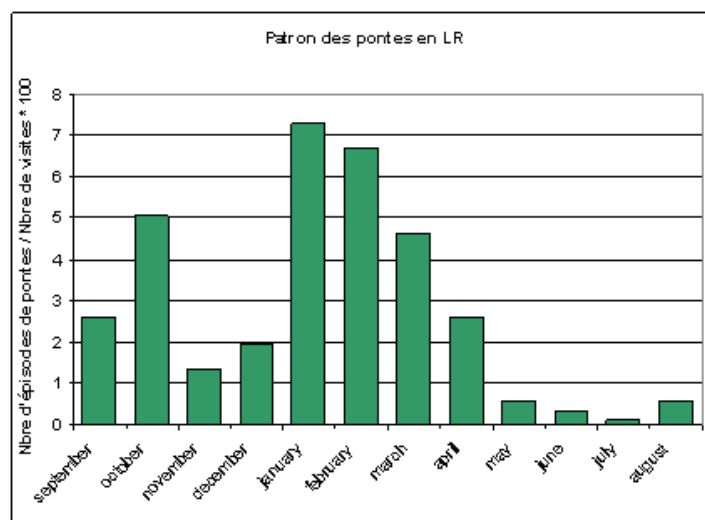


FIGURE 7.1 – Quantité de pontes de Pélodyte observées pendant l'année en Languedoc-Roussillon)

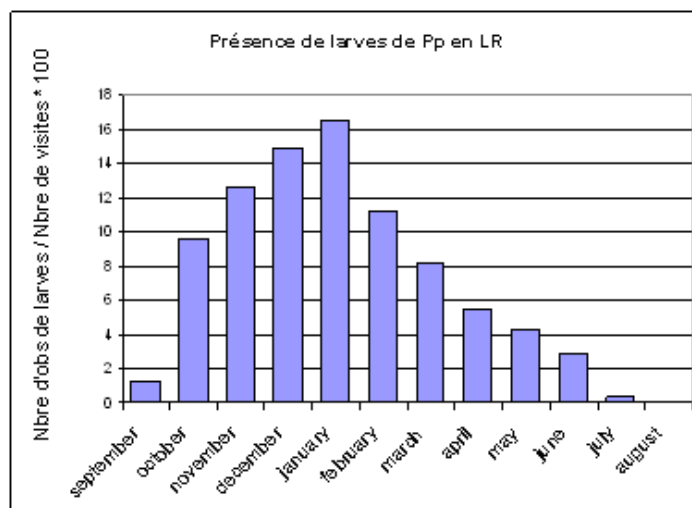


FIGURE 7.2 – Quantité de larves de Pélodyte observées pendant l'année en Languedoc-Roussillon)

volontairement contrastés pour mettre en lumière de potentielles adaptations locales) ou accumuler plus de données.

Ainsi nous n'avons pas trouvé d'effet de la prédation ou de la compétition sur la survie larvaire mais il peut y en avoir. De même, l'effet de priorité entre les cohortes d'automne et de printemps est observé sur la survie larvaire totale alors qu'il semblerait que l'impact des têtards d'automne sur les cohortes de printemps se fasse plutôt à l'éclosion (d'après nos observations de terrain). On peut espérer déterminer plus clairement les effets en analysant les résultats de la troisième année de suivi phénologique.

La reproduction automnale est efficace en terme de production de juvéniles (nombre absolu et survie) mais produit surtout des juvéniles plus grands et plus tôt que la reproduction printanière. On peut penser que cela leur donne un avantage sélectif mais il faudrait tester proprement cette hypothèse à l'aide, par exemple, de marquage des juvéniles, suivi de recapture lors des reproductions suivantes.

Les différences observées entre les traits larvaires des têtards d'automne et de printemps proviennent uniquement de la plasticité phénotypique en réponse aux conditions environnementales très différentes pendant le développement. Les têtards d'automne ont un gain de croissance (alors que la différenciation a cessé) pendant l'hiver. Il existe cependant des différences génétiques entre les mares : même élevés ensemble en conditions contrôlées, des individus issus de plusieurs mares vont présenter des différences de traits larvaires en fonction de leur origine. Ces différences peuvent être issues de différences génétiques entre sites ou simplement à des effets maternels liés à l'environnement dans lequel se trouvent les femelles.

Chez le Pélodyte, les reproductions d'automne et de printemps ne correspondent pas à l'existence de deux sous-populations temporelles ayant des stratégies de reproduction fixées. L'existence de stratégies aléatoires peut répondre à la définition du **bet-hedging** : dans ce cas, on attend que l'effort de reproduction d'un individu soit partagé entre les deux épisodes de pontes pour minimiser le risque d'avoir choisi systématiquement la mauvaise saison. Il est cependant probable que le Pélodyte présente uniquement une réponse opportuniste : soit il est capable de se reproduire à la fois en automne et au printemps (sans limitation énergétique) et en profite ou alors il ne peut se reproduire qu'à une seule saison et ceci ne dépendra que de son état énergétique à un moment donné. En effet, on peut supposer que le Pélodyte est incapable de stocker des réserves pour les utiliser plus tard ou que les femelles ont déjà ovulé avant d'arriver sur les mares. Dans ce cas, elles ne peuvent pas reporter la ponte et vont donc se reproduire même si les conditions sont finalement peu favorables. D'ailleurs, le Pélodyte a une tendance opportuniste, risque-tout : il se reproduit dans des flaques d'eau qui s'assèchent quelques jours plus tard (allant même jusqu'à accrocher ses œufs à un vieux ressort ou à les poser sur un caillou lorsqu'il ne trouve pas de support végétal adéquat). Peu d'autres espèces prennent autant de risques dans des milieux très temporaires à part le Crapaud calamite qui utilise des milieux encore plus éphémères.

Enfin, malgré la taille limitée des populations et la fragmentation de l'habitat, les cohortes de têtards ne présentent pas de fort niveau de consanguinité, ni de large variation du niveau de consanguinité entre individus qui auraient pu provoquer des corrélations entre hétérozygotie et **fitness**. Par contre, nous avons observé une corrélation négative entre la croissance des têtards et leur niveau d'hétérozygotie, phénomène qui suggère de la dépression hybride mais nous avons trop peu d'éléments pour discuter cette hypothèse. Le faible effectif de reproducteurs induit une forte structuration en famille dans les cohortes de têtards et ce qui provoque des corrélations entre allèles et **phénotypes** (pour la croissance et la survie).

Le Pélodyte a révélé, bien malgré lui, quelques uns de ses petits secrets mais il en reste. Quelques travaux sont encore en cours pour les percer et d'autres études peuvent être envisagées dans le même but.

### 7.1.2 Vision évolutive

Le contexte général de cette thèse était la réponse des **traits d'histoire de vie** à des variations spatiales et temporelles de la sélection naturelle. Petits rappels : Deux mécanismes principaux permettent de s'adapter à des changements environnementaux : la plasticité et la microévolution. Lorsque des populations sont réparties dans des environnements contrastés, on peut s'attendre à observer de l'adaptation locale. Ce phénomène se met en place s'il y a peu de plasticité phénotypique et peu de flux de gènes. De plus, des variations temporelles de l'environnement auront tendance à diminuer l'adaptation locale et favoriser des stratégies plastiques.

Dans le cadre de cette étude, je me suis surtout intéressée aux variations temporelles (plus particulièrement saisonnières) de l'environnement. J'ai montré qu'il y avait des flux de gènes entre cohortes de têtards pondus à différentes saisons. Nos résultats suivent alors les attendus théoriques, les différences de traits larvaires ne reflètent pas une divergence génétique en réponse à différentes niches temporelles. De plus, les reproductions d'automne et de printemps ne sont pas associées à des sites différents donc il ne s'agit pas non plus d'adaptation locale entre milieux contrastés. Ici, les variations des traits larvaires sont dues à une forte plasticité phénotypique et répondent à des conditions environnementales très contrastées issues de choix plastiques des reproducteurs. Joly et ses collègues avaient montré une canalisation de la taille à la métamorphose chez le Pélodyte [Joly et al., 2005] et nous montrons que cette canalisation est, en quelque sorte, levée lorsque les variations de l'environnement sont très importantes.

Lorsque les variations temporelles de l'environnement sont imprévisibles, des stratégies **bet-hedging** peuvent se mettre en place. Chez le Pélodyte, on pourrait envisager deux types de stratégies **bet-hedging** : une diversifiée où les individus répartissent aléatoirement leur effort reproductif entre l'automne et le printemps à l'intérieur d'une année ; une

"roulette russe" où un individu choisit aléatoirement de se reproduire en automne ou au printemps pour une année et relance les dés l'année suivante. Chez une espèce longévive, les deux types de stratégies peuvent exister ou coexister. Cependant, se reproduire deux fois dans l'année est énergétiquement coûteux, à la fois pour les mâles et les femelles donc la deuxième stratégie est plus probable. Des investigations plus poussées sont toutefois nécessaires pour confirmer ou infirmer ces hypothèses.

Le Pélodyte utilise des milieux fragmentés et très divers, il n'est donc pas impossible d'observer de l'adaptation locale sur les traits larvaires, par exemple. Par contre, de fortes migrations entre sites auront tendance à diminuer l'adaptation locale et à provoquer de la maladaptation or le Pélodyte a probablement de grandes capacités de dispersion (voir ci-dessous). Cependant, l'adaptation locale des traits larvaires est une des pistes pour expliquer le signal (isolé) de dépression hybride sur la croissance trouvée parmi les têtards de la mare du Fesq. Pour le moment, les analyses ne se sont pas penchées sur cet aspect mais les données sont en partie disponibles et cela pourrait constituer des perspectives d'étude.

Finalement, si la fragmentation peut favoriser l'adaptation locale, elle a aussi fortement tendance à diminuer la **taille efficace** des populations et à augmenter ainsi la consanguinité. Chez le Pélodyte, il est possible que les tailles de populations soient localement très petites ce qui conduit à avoir peu d'individus prenant part à production des larves. C'est ce que nous observons sur plusieurs sites et nous avons détaillé les effets en terme de relations entre génotypes et phénotypes. Par contre, nous n'observons pas de niveau élevé de consanguinité soit parce que le Pélodyte migre suffisamment pour éviter de se croiser avec ses apparentés, soit parce qu'il est capable de les reconnaître.

Pour conclure sur les changements globaux qui me servaient de prétexte à la section évolutive, le Pélodyte a été capable, lors de son histoire évolutive, de s'adapter aux changements climatiques lors du dernier recul post-glaciaire en exploitant deux niches temporelles disponibles. Plus au nord, la seule niche disponible est le printemps mais lorsque les conditions sont douces, le Pélodyte se risque à une reproduction automnale. Cette grande plasticité dans les **traits d'histoire de vie** lui confère un atout pour résister aux changements climatiques en cours. De plus, il semble que la fragmentation de son habitat ne soit pas encore source de désagréments évolutifs (dérive ou dépression de consanguinité), potentiellement grâce à ses capacités de dispersion et d'exploitation de milieux très temporaires (et artificiels) encore disponibles en nombre suffisants.

## 7.2 Travaux en cours et perspectives

Le génotypage des pontes en est encore à ses débuts (un site pour une seule année alors que quatre sites ont été échantillonnés sur deux ans) mais apporte déjà quelques informations. Le but était de savoir si des individus venaient se reproduire à la fois en automne et au printemps au cours d'une même année. Il semblerait (pour le moment) que ceci n'arrive pas dans un site donné. Dans le même but, j'ai analysé les distributions

d'apparementement entre paires d'individus appartenant à une cohorte d'automne et à une cohorte de printemps. Ces distributions ne diffèrent pas d'une distribution d'individus non apparentés, confirmant, là aussi, que les reproducteurs ne viennent pas à deux reprises se reproduire la même année dans un site donné. Cependant, il est probable que des individus puissent passer d'une mare à l'autre pour se reproduire, surtout dans des zones où les différents sites sont très rapprochés (Causse d'Aumelas à Cournonterral). Le génotypage complet des pontes (en lien avec celui de quelques adultes capturés lors d'épisodes de reproduction) devrait permettre de mieux savoir ce que fait un reproducteur (mâle et femelle) au cours de sa vie (du moins pendant deux années consécutives). Pour commencer il nous faudra compléter le génotypage pour la deuxième année sur le site déjà génotypé et choisir au moins un deuxième site dont l'analyse ne soit pas trop complexe (plutôt un petit site isolé pour limiter le nombre de reproducteurs potentiels).

Le génotypage des pontes a aussi permis de proposer que certaines pontes sont issues de multipaternités. Ceci est à mettre en relation avec les figures d'accouplement multiple observées à plusieurs reprises sur le terrain (une femelle et jusqu'à quatre mâles). Pour confirmer l'existence de multipaternité des pontes chez le Pélodyte, il est nécessaire d'utiliser plus de marqueurs microsatellite pour génotyper à nouveau les pontes qui semblent provenir de plusieurs pères. Ceci est déjà en cours puisque les marqueurs définis pour cette espèce par une équipe portugaise ont été partiellement testés. De plus, il pourrait être intéressant de savoir quel est le mâle qui fertilise la plus grande partie des œufs (on peut supposer que c'est celui qui est vraiment fixé en amplexus lombaire, peut-être le premier arrivé) et quel est l'avantage retiré par les mâles supplémentaires en terme de succès reproducteur.

Pour mieux comprendre si les stratégies de reproduction peuvent être un simple opportunisme, une meilleure connaissance des investissements énergétiques des reproducteurs est nécessaire : le Pélodyte est-il un "income-breeder" ou un "capital-breeder" ? Du côté des femelles, il serait intéressant de savoir si une ponte peut être reportée ce qui peut être estimé en vérifiant (par dissection) si les femelles arrivant sur le lieu de ponte ont déjà ovulé (et aussi en ayant une meilleure connaissance de l'appareil génital de la femelle Pélodyte : structure et longueur des oviductes, notamment).

L'étude de la différenciation génétique spatiale montre peu de structuration génétique en lien avec la structure géographique observée (Figure 7.3) : deux mares d'Aumelas ne sont pas moins différentes entre elles qu'une mare d'Aumelas et une mare de Cazevieille. Le Pélodyte aurait donc des capacités de dispersion relativement importantes. On peut relier cette idée avec l'hypothèse que le Pélodyte est une espèce pionnière : lorsqu'un nouveau site est créé, le Pélodyte est parmi les premiers (voire le premier) à l'exploiter (c'est en partie ce qu'avait montré Alex Richter-Boix en étudiant les phénomènes d'extinction/colonisation des populations de Pélodyte).

Les capacités de dispersion du Pélodyte sont encore totalement inconnues mais ces informations seraient nécessaires pour comprendre à la fois les patrons de reproduction et

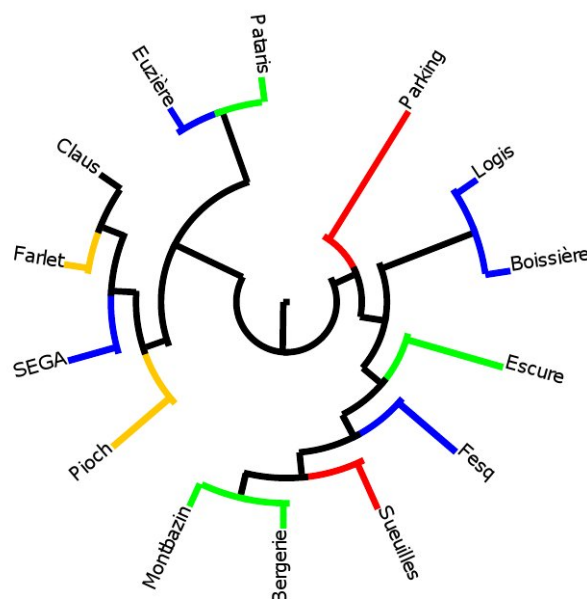


FIGURE 7.3 – Arbre construit à partir des valeurs de  $F_{st}$  entre sites. Les sites d'une même couleur appartiennent à la même zone géographique. Lorsque plusieurs cohortes ont été échantillonnées pour un même site, les données ont été groupées.

également les structures génétiques spatiales observées. Une première approche simple serait d'utiliser la base Languedoc-Roussillon et d'estimer, à partir des observations d'adultes isolés, quelle est la distance parcourue par un adulte depuis la mare (connue) la plus proche. Les autres approches sont beaucoup plus complexes et nécessitent à la fois du marquage (potentiellement avec émetteur) et un suivi de terrain complexe pour retrouver des *Pélodytes* en pleine nature.

Nous avons étudié la contribution relative de la reproduction d'automne et de celle de printemps dans la production de juvéniles et avons également estimé que les juvéniles d'automne présentaient quelques avantages sur leurs congénères de printemps. Ceci nécessiterait d'être vérifié en quantifiant la survie juvénile. Ce type de suivi est rarement effectué chez les amphibiens et les estimations de survie juvénile sont peu nombreuses. Là encore, cela nécessite un marquage intensif sur plusieurs sites et il pourrait être utile de travailler au moins sur un site isolé afin de limiter la zone de prospection pour retrouver les individus lors des premières reproductions. Chez les mâles, il suffit, normalement, d'attendre une année pour voir revenir des adultes matures sexuellement à partir des juvéniles marqués. Chez les femelles, un tel suivi implique d'attendre potentiellement jusqu'à trois années avant que les femelles marquées viennent se reproduire. Il s'agit donc d'un suivi à relativement long terme qui nécessite une implication forte.

Enfin, il serait tentant de mener encore quelques expériences d'élevage larvaire en

conditions contrôlées. Le premier objectif serait de mieux connaître les potentiels effets de priorité entre les deux cohortes. Ainsi, on pourrait vérifier que les têtards d'automne mangent bien des œufs de Pélodyte pondus au printemps (même si cela a déjà été montré sur des œufs de crapaud calamite) et voir l'effet de la présence de vieux têtards sur la survie et le développement des têtards nouvellement éclos. De plus, les résultats obtenus en laboratoire sur les traits de vie larvaire en réponse à une baisse de la température (de 18°C à 20°C) sont très rarement observés chez des amphibiens et sont plutôt difficiles à expliquer. Nous avons proposé des hypothèses faisant intervenir les réponses différentielles de la différenciation et de la croissance à la température. Il serait utile de tester correctement ces hypothèses en construisant les normes de réaction appropriées. Le dernier objectif serait de pouvoir conduire des expériences de génétique quantitative en utilisant des demi-frères. Cette méthode permet d'estimer l'héritabilité au sens strict en se débarrassant des effets maternels (qui sont souvent importants chez les amphibiens). Pour réaliser ce type d'expérience, il faut disposer d'adultes sur le point de se reproduire sur le terrain et les amener en laboratoire. Ensuite, les protocoles varient mais impliquent le plus souvent de sacrifier quelques mâles pour récupérer le sperme et féconder les œufs (il n'est pas forcément nécessaire de sacrifier les femelles). On le voit, ce type d'expérience de génétique quantitative est beaucoup plus complexe que celle que j'ai utilisée.

Une dernière citation pour conclure :

Comment faire taire les grenouilles : "Prends de la graisse de crocodile et prépare-la avec de la cire blanche, fais-en un lumignon. Allume-le où sont les grenouilles, elles se tairont toutes."

Les admirables secrets d'Albert le Grand. 1791



## Annexe A

---

# Bibliographie

- Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J., and Ram, S. J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7) :36–42.
- Acemav, Duguet, R., and Melki, F. (2003). *Les amphibiens de France, Belgique et Luxembourg*. éditions Biotope. Mèze (France).
- Alleaume-Benharira, M., Pen, I. R., and Ronce, O. (2006). Geographical patterns of adaptation within a species' range : interactions between drift and gene flow. *J Evol Biol*, 19(1) :203–215.
- Altwegg, R. and Reyer, H. U. (2003). Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution*, 57(4) :872–882.
- Anders, A. B. M. D. M. N. B. (2001). Intraspecific resource partitioning in brown trout : the temporal distribution of foraging is determined by social rank. *Journal of Animal Ecology*, 70(6) :980–986.
- Andersen, L. W., Fog, K., and Damgaard, C. (2004). Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 271(1545) :1293–1302.
- Angel, F. (1946). *Faune de France. 45. Reptiles et Amphibiens*. Librairie de la Faculté des Sciences, Paris.
- Angilletta, M. J., Niewiarowski, P. H., and Navas, C. A. (2002). The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*, 27(4) :249–268.
- Anholt, B. R., Negovetic, S., and Som, C. (1998). Methods for Anaesthetizing and Marking Larval Anurans. *Herpetological Review*, 29(3) :153–154.
- Audo, M. C., Mann, T. M., Polk, T. L., Loudenslager, C. M., Diehl, W. J., and Altig, R. (1995). Food-Deprivation during Different Periods of Tadpole (*Hyla-Chrysoscelis*) Ontogeny Affects Metamorphic Performance Differently. *Oecologia*, 103(4) :518–522.
- Aveyron, L. P. O. (2008). *Faune sauvage en Aveyron - Atlas des vertébrés*. Rodez.
- Baker, G. C. and Beebee, T. J. C. (2000). Evidence for the induction of interference competition between anuran larvae in plastic pond cages. *Amphibia-Reptilia*, 21(1) :25–37.

- Beebee, T. J. C. (1995). Amphibian Breeding and Climate. *Nature*, 374(6519) :219–220.
- Beebee, T. J. C. (1996). *Ecology and conservation of amphibians*. Conservation Biology Series. Chapman and Hall, London.
- Beebee, T. J. C. (2002). Amphibian phenology and climate change. *Conservation Biology*, 16(6) :1454–1454.
- Beebee, T. J. C. and Griffiths, R. A. (2005). The amphibian decline crisis : A watershed for conservation biology ? *Biological Conservation*, 125(3) :271–285.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., and Bonhomme, F. (1996). GENETIX 4.02 logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations.
- Bertrand, A. and Crochet, P. A. (1992). *Amphibiens et Reptiles d'Ariège*. Association des Naturalistes de l'Ariège, Clermont.
- Berven, K. A. (1982). The genetic basis of altitudinal variation in the wood frog *Rana sylvatica* II. An experimental analysis of larval development. *Oecologia*, 52(3) :360–369.
- Berven, K. A. (1987). The Heritable Basis of Variation in Larval Developmental Patterns within Populations of the Wood Frog (*Rana-Sylvatica*). *Evolution*, 41(5) :1088–1097.
- Bierne, N., Tsitrone, A., and David, P. (2000b). An inbreeding model of associative overdominance during a population bottleneck. *Genetics*, 155(4) :1981–1990.
- Bishop, D. T. and Cannings, C. (1976). Models of animal conflict. *Advances in Applied Probability*, 8(4) :616–621.
- Blaustein, A. R., Belden, L. K., Olson, D. H., Green, D. M., Root, T. L., and Kiesecker, J. M. (2001). Amphibian breeding and climate change. *Conservation Biology*, 15(6) :1804–1809.
- Blaustein, L. and Margalit, J. (1996). Priority effects in temporary pools ; Nature and outcome of mosquito larva toad tadpole interactions depend on order of entrance (vol 65, pg 77, 1996). *Journal of Animal Ecology*, 65(3) :400–400.
- Blouin, M. S. (1992b). Genetic Correlations among Morphometric Traits and Rates of Growth and Differentiation in the Green Tree Frog, *Hyla-Cinerea*. *Evolution*, 46(3) :735–744.
- Blouin, M. S. (2003). DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends In Ecology and Evolution*, 18(10) :503–511.
- Blouin, M. S. and Brown, S. T. (2000). Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. *Oecologia*, 125(3) :358–361.
- Both, C., Artemyev, A. V., Blaauw, B., Cowie, R. J., Dekhuijzen, A. J., Eeva, T., Enemar, A., Gustafsson, L., Ivankina, E. V., Jarvinen, A., Metcalfe, N. B., Nyholm, N. E. I., Potti, J., Ravussin, P. A., Sanz, J. J., Silverin, B., Slater, F. M., Sokolov, L. V., Torok, J., Winkel, W., Wright, J., Zang, H., and Visser, M. E. (2004). Large-scale geographical variation confirms that climate change causes birds to lay earlier. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 271(1549) :1657–1662.

- 
- Britten, H. B. (1996). Meta-analyses of the association between multilocus heterozygosity and fitness. *Evolution*, 50(6) :2158–2164.
- Brodie, E. D., Moore, A. J., and Janzen, F. J. (1995). Visualizing and Quantifying Natural-Selection. *Trends in Ecology and Evolution*, 10(8) :313–318.
- Broquet, T., Jacquierey, J., and Perrin, N. (2008). Opportunity for sexual selection and effective population size in the lek-breeding European treefrog (*Hyla arborea*). *Evolution*, 63(3) :674–683.
- Brown, D. D. and Cai, L. Q. (2007). Amphibian metamorphosis. *Developmental Biology*, 306(1) :20–33.
- Bruseo, J. A. and Barry, Ronald E., J. (1995). Temporal Activity of Syntopic *Peromyscus* in the Central Appalachians. *Journal of Mammalogy*, 76(1) :78–82.
- Bush, G. L. (1975). Modes of Animal Speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 6 :339–364.
- Carey, C. and Alexander, M. A. (2003). Climate change and amphibian declines : is there a link ? *Diversity and Distributions*, 9(2) :111–121.
- Carothers, J. H. and Jaksic, F. M. (1984). Time as a Niche Difference - the Role of Interference Competition. *Oikos*, 42(3) :403–406.
- Castanet, J. and Guyétant, R. (1989). *Atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles de France*. Société Herpétologique de France, Paris.
- Chapman, J. R., Nakagawa, S., Coltman, D. W., Slate, J., and Sheldon, B. C. (2009). A quantitative review of heterozygosity-fitness correlations in animal populations. *Molecular Ecology*, 18(13) :2746–2765.
- Charlesworth, D. and Willis, J. H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, 10 :783–796.
- Charmantier, A., McCleery, R. H., Cole, L. R., Perrins, C., Kruuk, L. E. B., and Sheldon, B. C. (2008). Adaptive phenotypic plasticity in response to climate change in a wild bird population. *Science*, 320(5877) :800–803.
- Charpentier, M. J. E., Prugnolle, F., Gimenez, O., and Widdig, A. (2008). Genetic heterozygosity and sociality in a primate species. *Behavior Genetics*, 38(2) :151–158.
- Clairambault, P., Janvier, P., Rage, J. C., and Francillon, H. Amphibiens, Anoures, Urodeles, Encyclopedia Universalis. In *Encyclopaedia Universalis*.
- Cohen, D. (1970). A theoretical model for the optimal timing of diapause. *Am*, 104(938) :389–400.
- Crick, H. Q. P., Dudley, C., Glue, D. E., and Thomson, D. L. (1997). UK birds are laying eggs earlier. *Nature*, 388(6642) :526–526.
- Crump, M. L. (1991). Choice of Oviposition Site and Egg Load Assessment by a Treefrog. *Herpetologica*, 47(3) :308–315.

- Csillery, K., Johnson, T., Beraldi, D., Clutton-Brock, T., Coltman, D., Hansson, B., Spong, G., and Pemberton, J. M. (2006). Performance of marker-based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates. *Genetics*, 173(4) :2091–2101.
- Cushman, S. A. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians : A review and prospectus. *Biological Conservation*, 128(2) :231–240.
- Darwin, C. R. (1843). *The zoology of the voyage of the H.M.S. Beagle, under the command of Captain Fitzroy, during the years 1832 to 1836*. Smith Elder and Co. Publishers, London.
- David, P. (1997). Modeling the genetic basis of heterosis : Tests of alternative hypotheses. *Evolution*, 51(4) :1049–1057.
- David, P. and Jarne, P. (1997). Context-dependent survival differences among electrophoretic genotypes in natural populations of the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Genetics*, 146(1) :335–344.
- David, P., Pujol, B., Viard, F., Castella, V., and Goudet, J. (2007). Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology*, 16 :2474–2487.
- Dayton, G. H. and Wapo, S. D. (2002). Cannibalistic behavior in *Scaphiopus couchii* : more evidence for larval anuran oophagy. *Journal of Herpetology*, 36(3) :531–532.
- De La Cépède, B. G. (1788). *Histoire Naturelle des Quadrupèdes Ovipares et des Serpens*, volume 1.
- Debat, V. and David, P. (2001). Mapping phenotypes : canalization, plasticity and developmental stability. *Trends in Ecology and Evolution*, 16 :555–561.
- Destre, R., d'Andurain, P., Fonderflick, J., Parayre, C., and Coll, A. (2000). *Faune sauvage de Lozère. Les vertébrés*.
- DeWitt, T. J., Sih, A., and Wilson, D. S. (1998). Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*, 13(2) :77–81.
- Diaz-Paniagua, C. (1988). Temporal segregation in larval amphibian communities in temporary ponds at a locality in SW Spain. *Amphibia-Reptilia*, 9 :15–26.
- Diaz-paniagua, C. (1989). Larval diets of two anuran species, *Pelodytes punctatus* and *Bufo bufo*, in SW Spain. *Amphibia-Reptilia*, 10 :71–75.
- Dixo, M., Metzger, J. P., Morgante, J. S., and Zamudio, K. R. (2009). Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biological Conservation*, 142(8) :1560–1569.
- Dodd, C. K., J. (2010). *Amphibian Ecology and Conservation. A handbook of Techniques*. Techniques in Ecology and Conservation Series. Oxford University Press, Oxford.
- Doria, G. and Salvidio, S. (1994). *Atlante degli anifbi e rettili della liguria*. Regione liguria.
- Dudash, M. R. and Fenster, C. B. (2000). Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations. In Young, A. G. and Clarke, G. M., editors, *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge University Press, Cambridge.

- 
- Edmands, S. (1999). Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a wide range of divergence. *Evolution*, 53(6) :1757–1768.
- Eitam, A., Leon, B., and Mangel, M. (2005). Density and Intercohort Priority Effects on Larval Salamandra salamandra in Temporary Pools. *Oecologia*, 146(1) :36–42.
- Escobar, J. S., Nicot, A., and David, P. (2008). The Different Sources of Variation in Inbreeding Depression, Heterosis and Outbreeding Depression in a Metapopulation of Physa acuta. *Genetics*, 180(3) :1593–1608.
- Esteban, A., Sanchez-Herraiz, M. J., Barbadillo, L. J., Castanet, J., and Marquez, R. (2002). Effects of age, size and temperature on the advertisement calls of two Spanish populations of Pelodytes punctatus. *Amphibia-Reptilia*, 23(3) :249–258.
- Esteban, M., Sanchez-Herraiz, M. J., Barbadillo, L. J., and Castanet, J. (2004). Age structure and growth in an isolated population of Pelodytes punctatus in northern Spain. *Journal of Natural History*, 38(21) :2789–2801.
- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0) : An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1 :47–50.
- Fenster, C. B. and Galloway, L. F. (2000). Inbreeding and outbreeding depression in natural populations of Chamaecrista fasciculata (Fabaceae). *Conservation Biology*, 14(5) :1406–1412.
- Fox, C. W. and Rauter, C. M. (2003). Bet-hedging and the evolution of multiple mating. *Evolutionary Ecology Res*, 5 :273–286.
- Fox, H. (1984). *Amphibian Morphogenesis*. Humana Press, Clifton, New Jersey.
- Frazer (1973). *Amphibian*. Chapman and Hall, London.
- Friesen, V. L., Smith, A. L., Gomez-Diaz, E., Bolton, M., Furness, R. W., Gonzalez-Solis, J., and Monteiro, L. R. (2007). Sympatric speciation by allochrony in a seabird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47) :18589–18594.
- Funk, W. C., Blouin, M. S., Corn, P. S., Maxell, B. A., Pilliod, D. S., Amish, S., and Allendorf, F. W. (2005). Population structure of Columbia spotted frogs (Rana luteiventris) is strongly affected by the landscape. *Molecular Ecology*, 14(2) :483–496.
- Garcia-Paris, M., Buchholz, D. R., and Parra-Olea, G. (2003). Phylogenetic relationships of Pelobatoidea re-examined using mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 28(1) :12–23.
- Geniez, P. and Cheylan, M. *Les Amphibiens et Reptiles du Languedoc-Roussillon et régions limitrophes. Atlas biogéographique. Meridionalis*. Meridionalis. in prep, Mèze.
- Geniez, P. and Cheylan, M. (2003). *Amphibiens et Reptiles de France*. Educagri, Montpellier.
- Gibbs, J. P. and Breisch, A. R. (2001). Climate warming and calling phenology of frogs near Ithaca, New York, 1900–1999. *Conservation Biology*, 15(4) :1175–1178.

- Goodnight, K. F. and Queller, D. C. (1999). Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology*, 8(7) :1231–1234.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16 :183–190.
- Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2) : A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86(6) :485–486.
- Gratani, L. and Crescente, M. F. (1997). Phenology and leaf adaptive strategies of Mediterranean maquis plants. *Ecologica Mediterranea*, 23 :11–19.
- Guyétant, R., Temmermans, W., and Avriillier, J. N. (1999). Phenology of the reproduction of *Pelodytes punctatus* Daudin, 1802 (Amphibia, Anura). *Amphibia-Reptilia*, 20(2) :149–160.
- Halloy, M. (2006). Choice of oviposition site in *Pleurodema borellii* (Leptodactylidae) : importance of conspecific tadpole size. *South American Journal of Herpetology*, 1(1) :72–78.
- Halloy, M. and Fiano, J. M. (2000). Oviposition site selection in *Pleurodema borellii* (Anura : Leptodactylidae) may be influenced by tadpole presence. *Copeia*, (2) :606–609.
- Halverson, M. A., Skelly, D. K., and Caccone, A. (2006). Inbreeding linked to amphibian survival in the wild but not in the laboratory. *Journal of Heredity*, 97(5) :499–507.
- Hansson, B., Westerdaal, H., Hasselquist, D., Akesson, M., and Bensch, S. (2004). Does Linkage Disequilibrium Generate Heterozygosity-Fitness Correlations in Great Reed Warblers? *Evolution*, 58(4) :870–879.
- Hartel, T., Sas, I., Pernetta, A. P., and Gletsch, I. C. (2007). The reproductive dynamics of temperate amphibians : a review. *North-Western Journal of Zoology*, 3(2) :127–145.
- Hendry, A. P. and Day, T. (2005). Population structure attributable to reproductive time : isolation by time and adaptation by time. *Molecular Ecology*, 14(4) :901–916.
- Herpetologica, S. E. (1997). *Atlas of amphibians and reptiles in Europe*. Museum national d'histoire naturelle, Paris.
- Heyer, W. R. (1994). *Measuring and monitoring biological diversity : Standard methods for amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Holman, J. A. (1993). British Quaternary Herpetofaunas - a History of Adaptations to Pleistocene Disruptions. *Herpetological Journal*, 3(1) :1–7.
- Hopkins, W. A. (2007). Amphibians as models for studying environmental change. *Ilar Journal*, 48(3) :270–277.
- Jakob, C., Poizat, G., Veith, M., Seitz, A., and Crivelli, A. J. (2003b). Breeding phenology and larval distribution of amphibians in a Mediterranean pond network with unpredictable hydrology. *Hydrobiologia*, 499(1-3) :51–61.

- 
- Jaquiere, J., Guillaume, F., and Perrin, N. (2009). Predicting the Deleterious Effects of Mutation Load in Fragmented Populations. *Conservation Biology*, 23(1) :207–218.
- Jehle, R., Burke, T., and Arntzen, J. W. (2005). Delineating fine-scale genetic units in amphibians : Probing the primacy of ponds. *Conservation Genetics*, 6(2) :227–234.
- Joly, P., Morand, A., Plenet, S., and Grolet, O. (2005). Canalization of size at metamorphosis despite temperature and density variations in *Pelodytes punctatus*. *Herpetological Journal*, 15(1) :45–50.
- Jonsson, K. I., Herczeg, G., O'Hara, R. B., Soderman, F., ter Schure, A. F. H., Larsson, P., and Merila, J. (2009). Sexual patterns of prebreeding energy reserves in the common frog *Rana temporaria* along a latitudinal gradient. *Ecography*, 32(5) :831–839.
- Jourdan-Pineau, H., Nicot, A., Dupuy, V., David, P., and Crochet, P. A. (2009). Development of eight microsatellite markers in the parsley frog (*Pelodytes punctatus*). *Molecular Ecology Resources*, 9(1) :261–263.
- Kawecki, T. J. and Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, 7(12) :1225–1241.
- Kelly, C. A. (1992). Spatial and Temporal Variation in Selection on Correlated Life-History Traits and Plant Size in *Chamaecrista-Fasciculata*. *Evolution*, 46(6) :1658–1673.
- Kirkpatrick, M. and Barton, N. H. (1997). Evolution of a species' range. *American Naturalist*, 150(1) :1–23.
- Konovalov, D. A., Bajema, N., and Litow, B. (2005). Modified SIMPSON  $O(n^3)$  algorithm for the full sibship reconstruction problem. *Bioinformatics*, 21(20) :3912–3917.
- Lardner, B.
- Lardner, B. and Loman, J. (2003). Growth or reproduction? Resource allocation by female frogs *Rana temporaria*. *Oecologia*, 137(4) :541–546.
- Laugen, A. T., Laurila, A., Rasanen, K., and Merila, J. (2003b). Latitudinal countergradient variation in the common frog (*Rana temporaria*) development rates - evidence for local adaptation. *Journal of Evolutionary Biology*, 16(5) :996–1005.
- Laurila, A., Pakkasmaa, S., Crochet, P. A., and Merila, J. (2002b). Predator-induced plasticity in early life history and morphology in two anuran amphibians. *Oecologia*, 132(4) :524–530.
- Laurila, A. and Seppa, P. (1998). Multiple paternity in the common frog (*Rana temporaria*) : genetic evidence from tadpole kin groups. *Biological Journal of the Linnean Society*, 63(2) :221–232.
- Leimar, O. (2005). The evolution of phenotypic polymorphism : randomized strategies versus evolutionary branching. *Am. Nat.*, 165 :669–681.
- Lenormand, T. (2002). Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution*, 17(4) :183–189.
- Lesbarreres, D., Pagano, A., and Lode, T. (2003). Inbreeding and road effect zone in a Ranidae : the case of Agile frog, *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840. *Comptes Rendus Biologies*, 326 :S68–S72.

- Lesbarreres, D., Schmeller, D. S., Primmer, C. R., and Merila, J. (2007). Genetic variability predicts common frog (*Rana temporaria*) size at metamorphosis in the wild. *Heredity*, 99(1) :41–46.
- Lieutenant-Gosselin, M. and Bernatchez, L. (2006). Local heterozygosity-fitness correlations with global positive effects on fitness in threespine stickleback. *Evolution*, 60(8) :1658–1668.
- Livet, F. (1978). *Herpetofaune du Nord-Est de la Montagne Noire : Biogéographie et Ecologie*. PhD thesis, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- Llorente, G. A., Montori, A., Santos, X., and Carretero, M. A. (1995). *Atlas dels amfibis i reptils de Catalunya i Andorra*. Figueres.
- Lode, T., Holveck, M. J., and Lesbarreres, D. (2005). Asynchronous arrival pattern, operational sex ratio and occurrence of multiple paternities in a territorial breeding anuran, *Rana dalmatina*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 86(2) :191–200.
- Lode, T. and Lesbarreres, D. (2004). Multiple paternity in *Rana dalmatina*, a monogamous territorial breeding anuran. *Naturwissenschaften*, 91(1) :44–47.
- Loman, J. (2001). Intraspecific competition in tadpoles of *Rana arvalis* : does it matter in nature ? A field experiment. *Population Ecology*, 43(3) :253–263.
- Loman, J. (2009). Primary and secondary phenology. Does it pay a frog to spawn early ? *Journal of Zoology*, 279(1) :64–70.
- Loureiro, A., de Almeida, N. F., Carretero, M. A., and Paulo, O. S. (2008). *Atlas dos anfíbios e répteis de Portugal*.
- Lynch, M. (1991). The Genetic Interpretation of Inbreeding Depression and Outbreeding Depression. *Evolution*, 45(3) :622–629.
- Lynch, M. and Walsh, B. (1998). *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Manly, B. F. J. (1985). *The Statistics of Natural Selection on Animal Populations*. Chapman and Hall, London.
- Merila, J., Laurila, A., Pakkala, M., Rasanen, K., and Laugen, A. T. (2000b). Adaptive phenotypic plasticity in timing of metamorphosis in the common frog *Rana temporaria*. *Ecoscience*, 7(1) :18–24.
- Meunier, V. (1876). *Les animaux à métamorphose*.
- Meyer, A. (1987). Phenotypic Plasticity and Heterochrony in *Cichlasoma-Managuense* (Pisces, Cichlidae) and Their Implications for Speciation in Cichlid Fishes. *Evolution*, 41(6) :1357–1369.
- Miaud, C., Sanuy, D., and Avriillier, J. N. (2000b). Terrestrial movements of the natterjack toad *Bufo calamita* (Amphibia, Anura) in a semi-arid, agricultural landscape. *Amphibia-Reptilia*, 21(3) :357–369.
- Miller, A. H. (1962). Bimodal Occurrence of Breeding in an Equatorial Sparrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48(3) :396–and.



- 
- Miller-Rushing, A. J. and Primack, R. B. (2008). Global warming and flowering times in Thoreau's concord : A community perspective. *Ecology*, 89(2) :332–341.
- Morin, P. J., Lawler, S. P., and Johnson, E. A. (1990). Ecology and Breeding Phenology of Larval Hyla-Andersonii - the Disadvantages of Breeding Late. *Ecology*, 71(4) :1590–1598.
- Myers, E. M. and Zamudio, K. R. (2004). Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian : the effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. *Molecular Ecology*, 13(7) :1951–1963.
- Newman, R. A. (1998). Ecological constraints on amphibian metamorphosis : interactions of temperature and larval density with responses to changing food level. *Oecologia*, 115(1-2) :9–16.
- Nollert, A. and Nollert, C. (2003). *Guide des amphibiens d'Europe*. Delachaux et Niestlé, Paris, 383 edition.
- Ohta, T. (1971). Associative Overdominance Caused by Linked Detrimental Mutations. *Genetical Research*, 18(3) :277–and.
- Oloffson, H., Ripa, J., and Jonzen, N. (2009). Bet-hedging as an evolutionary game : the trade-off between egg size and number. *Proc. R. Soc. B*, 276 :2963–2969.
- Orizaola, G. and Laurila, A. (2009). Microgeographic variation in temperature-induced plasticity in an isolated amphibian metapopulation. *Evolutionary Ecology*, 23(6) :979–991.
- Pages, J. M. (1979). *Biogéographie et Ecologie des Amphibiens et Reptiles du Sud Ouest de la Montagne Noire*. PhD thesis, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Montpellier.
- Paillette, M., Oliveira, M. E., Rosa, H. D., and Crespo, E. G. (1992). Is there a dialect in Pelodytes punctatus from southern Portugal? *Amphibia-Reptilia*, 13(1) :97–107.
- Palo, J. U., Schmeller, D. S., Laurila, A., Primmer, C. R., Kuzmin, S. L., and Merila, J. (2004b). High degree of population subdivision in a widespread amphibian. *Molecular Ecology*, 13(9) :2631–2644.
- Parayre, C. (1996). *Des écosystèmes particuliers : les "lavognes" du Parc National des Cévennes. Etude physique et écologique*. PhD thesis, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Montpellier.
- Pargana, J. M., Marquez, R., Reques, R., Sanchez-Herraz, M. J., Tejedo, M., and Crespo, E. G. (2003). The mating call of Pelodytes ibericus (Anura, Pelodytidae). *Herpetological Journal*, 13(4) :199–204.
- Paris, M. G. (1985). *Los anfibios de Espana*. Publicaciones de extension agraria, Madrid.
- Parmesan, C. (2006). Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 37 :637–669.
- Perry, A. L., Low, P. J., Ellis, J. R., and Reynolds, J. D. (2005). Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science*, 308(5730) :1912–1915.
- Philippi, T. and Seger, J. (1989). Hedging Ones Evolutionary Bets, Revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 4(2) :41–44.

- Pilar, C. D. and Gabriel, M. M. (1998). Phenological pattern of fifteen Mediterranean phanerophytes from *Quercus ilex* communities of NE-Spain. *Plant Ecology*, 139(1) :103–112.
- Pleguezuelos, J. M., Marquez, R., and Lizana, M. (2002). *Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de Espana*. Direccion General de Conservacion de la Naturaleza-Asociacion Herpetologica Espanola (2a impresion), Madrid.
- Pottier, G. *Guide des reptiles et amphibiens de Midi-Pyrénées*. Les escapades naturalistes.
- Pottier, G. (2008). *Atlas de répartition des reptiles et amphibiens de Midi-Pyrénées*. Nature Midi-Pyrénées.
- Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., and Fogden, M. P. L. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Natu*, 439 :161–167.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2) :945–959.
- Przybylo, R., Sheldon, B. C., and Merila, J. (2000). Climatic effects on breeding and morphology : evidence for phenotypic plasticity. *Journal of Animal Ecology*, 69(3) :395–403.
- Pulliam, H. R. (1988). Sources, sinks, and population regulation. *Am*, 132(5) :652–661.
- Queller, D. C. and Goodnight, K. F. (1989). Estimating Relatedness Using Genetic-Markers. *Evolution*, 43(2) :258–275.
- Ramstad, K. M., Foote, C. J., and Olsen, J. B. (2003). Genetic and phenotypic evidence of reproductive isolation between seasonal runs of Sockeye salmon in Bear Lake, Alaska. *Transactions of the American Fisheries Society*, 132(5) :997–1013.
- Rasanen, K., Laurila, A., and Merila, J. (2003b). Geographic variation in acid stress tolerance of the moor frog, *Rana arvalis*. II. Adaptive maternal effects. *Evolution*, 57(2) :363–371.
- Raymond, M. and Rousset, F. (1995). Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86(3) :248–249.
- Reading, C. J. (1998). The effect of winter temperatures on the timing of breeding activity in the common toad *Bufo bufo*. *Oecologia*, 117(4) :469–475.
- Reading, C. J. (2003). The effects of variation in climatic temperature (1980-2001) on breeding activity and tadpole stage duration in the common toad, *Bufo bufo*. *Science of the Total Environment*, 310(1-3) :231–236.
- Reading, C. J. and Clarke, R. T. (1983). Male Breeding-Behavior and Mate Acquisition in the Common Toad, *Bufo-Bufo*. *Journal of Zoology*, 201(Oct) :237–246.
- Reading, C. J. and Clarke, R. T. (1999). Impacts of climate and density on the duration of the tadpole stage of the common toad *Bufo bufo*. *Oecologia*, 121(3) :310–315.
- Recoura, C. (2007). *Comment faire taire les grenouilles ? 2000 ans de science extravagante et d'animaux curieux*. Extravagances. Fyp Editions.

- 
- Relyea, R. A. (2002). Costs of phenotypic plasticity. *American Naturalist*, 159(3) :272–282.
- Relyea, R. A. (2005). The heritability of inducible defenses in tadpoles. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(4) :856–866.
- Relyea, R. A. (2007). Getting out alive : how predators affect the decision to metamorphose. *Oecologia*, 152(3) :389–400.
- Reques, R. and Tejedo, M. (1997). Reaction norms for metamorphic traits in natterjack toads to larval density and pond duration. *Journal of Evolutionary Biology*, 10(6) :829–851.
- Richter-Boix, A. (2005). *Pond breeding amphibian metacommunity structure : the importance of trade-offs*. PhD thesis, Universitat de Barcelona.
- Richter-Boix, A., Llorente, G. A., and Montori, A. (2004). Responses to competition effects of two anuran tadpoles according to life-history traits. *Oikos*, 106(1) :39–50.
- Richter-Boix, A., Llorente, G. A., and Montori, A. (2006a). A comparative analysis of the adaptive developmental plasticity hypothesis in six Mediterranean anuran species along a pond permanency gradient. *Evolutionary Ecology Research*, 8(6) :1139–1154.
- Richter-Boix, A., Llorente, G. A., and Montori, A. (2006b). Breeding phenology of an amphibian community in a Mediterranean area. *Amphibia-Reptilia*, 27(4) :549–559.
- Richter-Boix, A., Llorente, G. A., and Montori, A. (2006c). Effects of phenotypic plasticity on post-metamorphic traits during pre-metamorphic stages in the anuran *Pelodytes punctatus*. *Evolutionary Ecology Research*, 8(2) :309–320.
- Richter-Boix, A., Llorente, G. A., and Montori, A. (2007b). Hierarchical competition in pond-breeding anuran larvae in a Mediterranean area. *Amphibia-reptilia*, 28(2) :247–261.
- Richter-Boix, A., Llorente, G. A., and Montori, A. (2007c). Structure and dynamics of an amphibian metacommunity in two regions. *Journal of Animal Ecology*, 76(3) :607–618.
- Rousset, F. (2008). GENEPOP ' 007 : a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1) :103–106.
- Rowe, G. and Beebee, T. J. C. (2007). Defining population boundaries : use of three Bayesian approaches with microsatellite data from British natterjack toads (*Bufo calamita*). *Mol Ecol*, 16(4) :785–796.
- Russello, M. A. and Amato, G. (2004). Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology*, 13(9) :2829–2840.
- Ryan, T. J. and Plague, G. R. (2004). Hatching asynchrony, survival, and the fitness of alternative adult morphs in *Ambystoma talpoideum*. *Oecologia*, 140(1) :46–51.
- Sadeh, A., Mangel, M., and Blaustein, L. (2009). Context-dependent reproductive habitat selection : the interactive roles of structural complexity and cannibalistic conspecifics. *Ecology Letters*, 12(11) :1158–1164.

- Sagvik, J., Uller, T., and Olsson, M. (2005). Outbreeding depression in the common frog, *Rana temporaria*. *Conservation Genetics*, 6(2) :205–211.
- Saiah, H. and Perrin, N. (1990). Autumnal Vs Spring Hatching in the Fairy Shrimp *Siphonophanes-Grubii* (Dybowski) (Crustacea, Anostraca) - Diversified Bet-Hedging Strategy. *Functional Ecology*, 4(6) :769–775.
- Salvador, A. and Paris, M. G. (2001). *Anfibios Espanoles*.
- Samollow, P. B. (1980). Selective Mortality and Reproduction in a Natural-Population of *Bufo-Boreas*. *Evolution*, 34(1) :18–39.
- Sanchez-Herraz, M. J., Barbadillo, L. J., Machordom, A., and Sanchez, B. (2000). A new species of pelodytid frog from the Iberian Peninsula. *Herpetologica*, 56(1) :105–118.
- Schmeller, D. S., Schregel, J., and Veith, M. (2007). The importance of heterozygosity in a frog's life. *Naturwissenschaften*, 94(5) :360–366.
- Sinsch, U. (1992). Structure and Dynamic of a Natterjack Toad Metapopulation (*Bufo-Calamita*). *Oecologia*, 90(4) :489–499.
- Sinsch, U. (1997). Postmetamorphic dispersal and recruitment of first breeders in a *Bufo calamita* metapopulation. *Oecologia*, 112(1) :42–47.
- Smith, A. L. and Green, D. M. (2005). Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation : are all amphibian populations metapopulations ? *Eco*, 28(1) :110–128.
- Smith, D. C. (1987). Adult Recruitment in Chorus Frogs - Effects of Size and Date at Metamorphosis. *Ecology*, 68(2) :344–350.
- Smith, M. A. and Green, D. M. (2006). Sex, isolation and fidelity : unbiased long-distance dispersal in a terrestrial amphibian. *Ecography*, 29(5) :649–658.
- Smith-Gill, S. J. and Berven, K. A. (1979). Predicting Amphibian Metamorphosis. *American Naturalist*, 113(4) :563–585.
- Sommer, S. and Pearman, P. B. (2003). Quantitative genetic analysis of larval life history traits in two alpine populations of *Rana temporaria*. *Genetica*, 118(1) :1–10.
- Stearns, S. C. (1989). The Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity - Phenotypic Sources of Variation among Organisms Can Be Described by Developmental Switches and Reaction Norms. *Bioscience*, 39(7) :436–445.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L., and Waller, R. W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306(5702) :1783–1786.
- Summers, K. (1999). The effects of cannibalism on Amazonian poison frog egg and tadpole deposition and survivorship in *Heliconia* axil pools. *Oecologia*, 119(4) :557–564.
- Taylor, A. C. and Kollros, J. J. (1946). Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.*, 94 :7–24.
- Tejedo, M. (1991). Effect of Predation by 2 Species of Sympatric Tadpoles on Embryo Survival in Natterjack Toads (*Bufo-Calamita*). *Herpetologica*, 47(3) :322–327.

- 
- Thirion, J. M., Grillet, P., and Geniez, P. (2002). *Les Amphibiens et les Reptiles du centre-ouest de la France - Région Poitou-Charentes et départements limitrophes*. éditions Biotope. Mèze (France).
- Thomas, J. P., Faugier, C., Issartel, G., and Jacob, L. (2003). *Reptiles et amphibiens d'Ardèche*. CORA/Parc naturel régional des Monts d'Ardèche.
- Toxopeus, A. G., Ohm, M., and Arntzen, J. W. (1993). Reproductive biology of the parsley frog, *Pelodytes punctatus*, at the northernmost part of its range. *Amphibia-Reptilia*, 14 :131–147.
- Van Burskirk, J. and Arioli, M. (2005). Habitat specialization and adaptive phenotypic divergence of anuran populations. *Journal of E*, 18(3) :596–608.
- van de Vliet, M. S., Diekmann, O. E., Serrao, E. T. A., and Beja, P. (2009). Highly polymorphic microsatellite loci for the Parsley frog (*Pelodytes punctatus*) : characterization and testing for cross-species amplification. *Conservation Genetics*, 10(3) :665–668.
- Van Horn, R. C., Altmann, J., and Alberts, S. C. (2008). Can't get there from here : inferring kinship from pairwise genetic relatedness. *Animal Behaviour*, 75 :1173–1180.
- Via, S., Gomulkiewicz, R., Dejong, G., Scheiner, S. M., Schlichting, C. D., and Vantienen, P. H. (1995). Adaptive Phenotypic Plasticity - Consensus and Controversy. *Trends in Ecology and Evolution*, 10(5) :212–217.
- Vial, J. L. (1973). *Evolutionary Biology of the Anurans : Contemporary Research on Major Problems*. University of Mississippi press.
- Vignoli, L., Bologna, M. A., and Luiselli, L. (2007). Seasonal patterns of activity and community structure in a amphibian assemblage at a pond network with variable hydrology. *Acta Oecologica*, 31 :185–192.
- Voss, S. R.
- Waddington, C. H. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 150 :563–565.
- Waldman, B. and McKinnon, J. S. (1993). Inbreeding and outbreeding in Fishes, Amphibians and Reptiles. In Tornhill, N. W., editor, *The natural history of inbreeding and outbreeding : theoretical and empirical perspectives*. University of Chicago Press, Chicago.
- Walther, G. R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J. C., Fromentin, J. M., Hoegh-Guldberg, O., and Bairlein, F. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416(6879) :389–395.
- Wells, K. D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. University of Chicago Press.
- Wilbur, H. M. (1980). Complex Life-Cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11 :67–93.

- Wollenberg, K. C. and Measey, G. J. (2009). Why colour in subterranean vertebrates? Exploring the evolution of colour patterns in caecilian amphibians. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(5) :1046–1056.
- Yamamoto, S. and Sota, T. (2009). Incipient allochronic speciation by climatic disruption of the reproductive period. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 276(1668) :2711–2719.
- Zamudio, K. R. and Wieczorek, A. M. (2007). Fine-scale spatial genetic structure and dispersal among spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) breeding populations. *Mol Ecol*, 16(2) :257–274.

## **Annexe B**

---

### Primer note

## PERMANENT GENETIC RESOURCES

# Development of eight microsatellite markers in the parsley frog (*Pelodytes punctatus*)

HELENE JOURDAN-PINEAU, ANTOINE NICOT, VIRGINIE DUPUY, PATRICE DAVID  
and PIERRE-ANDRE CROCHET

Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5175, Canyus CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France

## Abstract

**We characterized eight microsatellite loci to study spatial and temporal population structure of *Pelodytes punctatus*, a European anuran that has a peculiar breeding pattern among amphibians. The eight loci proved to be highly polymorphic with the number of alleles per locus ranging from two to 15 within two populations. Cross-amplification indicates that those markers may be also useful for closely related species from the same family.**

*Keywords:* amphibian, anuran, microsatellites, *Pelodytes punctatus*

*Received 14 April 2008; revision accepted 21 May 2008*

The Parsley frog (*Pelodytes punctatus*) is a small toad belonging to the family Pelodytidae. It inhabits ponds in Western Europe (Guyétant *et al.* 1999). A peculiar characteristic of parsley frogs is the existence of two reproductive peaks (in spring and autumn) in Mediterranean environments (Richter-Boix *et al.* 2006). Parsley frogs are one of the few species that reproduce in autumn. Genetic studies are needed to better understand this unique reproductive strategy, and especially to what extent these two cohorts could represent different breeding pools as previously shown for *Bufo calamita* (Sinsch 1992). They would also provide a way to ascertain the spatial population structure and relationships with sister species *P. caucasicus* and *P. ibericus*, an important information in the context of global decline of amphibian populations. We describe here the development of eight microsatellite markers in *P. punctatus* that will be useful in such studies.

Whole genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) from tadpole tail muscle collected in the Jasses pond (Montpellier surroundings, 43.8657°N, 3.7828°E, France). Isolation of microsatellite loci from two enriched (TC<sub>10</sub> and TG<sub>10</sub>) libraries was performed following Dubois *et al.* (2005) using biotin-labelled microsatellite oligoprobes and streptavidin-coated magnetic beads. The enriched extracts were cloned into the pGEMt vector and used to transform XL1-Blue Supercompetent Cells. Recombinant clones were screened using a modified

polymerase chain reaction (PCR) method with primer pairs (TC)<sub>10</sub> or (TG)<sub>10</sub> for microsatellite repeat and AGE1 (5'-AAACAGCTATGACCATGATTAC-3') or AGE2 (5'-TTGTAAAACGACGGCCAGTG-3') on pGEMt vector (Waldbieser 1995).

We screened 1124 clones, of which 192 gave a positive signal and were sequenced by AGOWA. One hundred fifteen sequences contained repeated motifs, among which 17 were selected. We designed primers for their flanking regions using the software Primer 3 (Rozen & Skaletsky 2000). Twelve loci provided satisfying signal after PCR amplifications.

Our loci were tested by typing two population samples of 31 individuals, namely Pataris (43.5694°N, 3.6951°E) and Boissière (43.83368°N, 3.74608°E; Southern France around Montpellier). Genomic DNA was extracted from tadpole tail tissue using the Chelex method based on the protocol of Walsh *et al.* (1991). Specifically, 5 mg of tissue were dried then covered with 5% Chelex solution (Bio-Rad Chelex 100 Resin in TrisEDTA 10 mM) and 5 µL of proteinase K (QIAGEN) was added per sample. Incubation lasted 5 h before final denaturation of proteinase K at 95 °C. After centrifugation, 1 µL of supernatant was used as amplification template in each PCR. Amplification was conducted on a Mastercycler thermocycler (Eppendorf) in 10 µL final volume containing 1 µL of DNA from previous extraction, 0.2 µM of each primer and 5 µL of the QIAGEN multiplex PCR kit. All PCR profiles consisted of 15 min at 95 °C, 30 cycles including 30 s at 94 °C, 90 s at a locus-specific annealing temperature (see Table 1), and 60 s at 72 °C, followed by 30 min final extension at 60 °C. For genotyping, 3 µL of

Correspondence: Hélène Jourdan-Pineau, Fax: (+33) 4 67 41 21 38; E-mail: helene.jourdan@cefe.cnrs.fr



**Table 1** Characterization of eight polymorphic microsatellite loci in *Pelodytes punctatus*

Locus	Accession no.	Primer sequence (5'-3')	$T_a$	Repeated motif	All sites			Pataris ( $n = 31$ )			Boissière ( $n = 31$ )		
					Size range	N all	$F_{ST}$	N all	$H_E$	$F_{IS}$	N all	$H_E$	$F_{IS}$
PPU2	EU626988	VICF: CCAGTCGACCCCTTGCAGATA R: TTGGCTGTTTGACACTTACTCC	57	$(AG)_{16}AA(AG)_3AA$	218–239	9	0.032	9	0.700	0.126	8	0.778	-0.122
PPU5	EU626989	NEDF: GATTTTGAATTGGGCAGGAA R: TCTCTGCCTTCCGTCCTGACT	57	$(AG)_9$	241–256	4	0.056	4	0.639	-0.009	3	0.579	-0.116
PPU6	EU626990	VICF: ACTTGGAAATCACATACATTT R: TGCATCACATCGTTAGAAAG	55	$(AC)_{18}$	237–289	4	0.109	3	0.068	-0.009	3	0.343	<b>0.534</b>
PPU10	EU626991	FAMF: TAATTACAGCCGCCGATCTT R: AAGTGAGTGAAAGGTCAGGTG	57	$(CT)_{11}$	183–195	5	0.064	5	0.667	0.131	4	0.664	-0.071
PPU11	EU626992	PETF: AGGAAGACATACACCGTTCAG R: AGTGTGCTCAGCAGGGCTAT	62	$ACAT(AC)_9$	198–202	2	-0.001	2	0.436	-0.273	2	0.482	-0.071
PPU15	EU626993	NEDF: TCCACTCATACCCCAATGTC R: GAGGCTTACCAATTAATGCCAAT	55	$(TCTG)_3(TC)_{13}$	224–249	3	-0.013	2	0.252	0.106	3	0.286	0.327
PPU16	EU626994	PETF: ACTGTGGGAATGTCAATGTCG R: TCAACCAGCAGTGTGTCTGTC	57	$(GATA)_{11}$	187–249	15	0.023	13	0.857	<b>0.060</b>	12	0.884	-0.022
PPU17	EU626995	VICF: AAATATGTTGGAAAGTATGACAC R: AATTAATTCTGCCCACTG	55	$(TG)_2TC(TG)_5TC(TG)_6TC(TG)_{10}$ $TC(TG)_2TC(TG)_{10}TC(TG)_7TC$ $(TG)_5TC(TG)_7TC(TG)_{10}$	85–104	6	0.049	5	0.727	0.159	6	0.700	0.126

$T_a$ , annealing temperature (in °C); N all, number of alleles;  $H_E$ , expected heterozygosity;  $F_{IS}$  (in bold numbers if values are significantly different from zero) and  $F_{ST}$  between the two populations. Except for PPU6 in Pataris where only 27 individuals were successfully genotyped; there was no missing genotyped individuals within those two populations. Primer sequence labels used are in superscript.

	<i>Pelobates cultripes</i>	<i>Pelodytes ibericus</i>	Range	<i>Pelodytes caucasicus</i>	Range
PPU2	–	–		–	
PPU5	–	+	257–284	+	231–233
PPU6	–	–		–	
PPU10	–	+	175–177	+	175
PPU11	–	+	192–194	–	
PPU15	–	–		–	
PPU16	–	+	199–215	–	
PPU17	–	+	212–217	–	

**Table 2** Cross-species amplification in close species using primers developed in *Pelodytes punctatus*. Six individuals were studied per species. Successful amplification is indicated as '+', unsuccessful as '–'; 'Range' is the range of allele sizes for the six genotyped individuals.

diluted multiplexed amplicon were pooled with 13 µL of de-ionized formamide and 0.2 µL GeneScan-500 LIZ Size Standard, and analysed on an ABI PRISM 3100 sequencer (Applied Biosystems). Four loci did not yield satisfactory results: PPU8, PPU9 and PPU13 were almost monomorphic and PPU1 had too many null alleles. Therefore, the following results are for the remaining eight loci which are multiplexed in two subsets (I: PPU2, PPU5, PPU10, and PPU16; and II: PPU6, PPU11, PPU15, and PPU17).

Allelic diversity ranged from two to 15 alleles over the two populations (results from analyses with GENETIX; Belkhir *et al.* 1996–2004; see Table 1). Tests for Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium (LD) were performed using Genepop (Raymond & Rousset 1995). Significant LD occurred in each population for a few pairs of loci (Pataris: PPU11/PPU15 and PPU15/PPU17; Boissière: PPU5/PPU11). Two loci, PPU6 and PPU16, showed significant deviation from HWE (after Bonferroni correction) for one of the two populations (see Table 1), whereas PPU2, PPU5, PPU10, PPU11, PPU15 and PPU17 were always found to be in HWE. Some occurrence of heterozygote excess or deficiency are not unexpected in these populations as a few breeding pairs may produce the totality of a cohort in small ponds.

Primers were tested in three other species: *Pelobates cultripes*, *Pelodytes caucasicus*, and *Pelodytes ibericus*. We obtained no amplification at all for *Pelobates cultripes*, which is not surprising given their high genetic divergence (Garcia-Paris *et al.* 2003). On the contrary, cross-species amplification was successful for five markers (out of eight) in *Pelodytes ibericus* and for only two markers in *Pelodytes caucasicus* (Table 2). Genotype results showed that, in *P. ibericus* and *P. caucasicus*, PPU5, PPU10, PPU11 and PPU16, alleles were closed to the range of *P. punctatus* alleles.

These microsatellite markers have thus appropriate properties to be used for future population genetic studies on Parsley frog for a better understanding of breeding pattern and dispersive abilities.

## Acknowledgements

We thank I. Gomez-Mestre for paying us with *P. ibericus* samples. Data used in this work were (partly) produced through molecular genetic analysis technical facilities of the IFR119 (Montpellier Environnement Biodiversité). This work was supported by grants to P. A. Crochet and P. David from the French Agence Nationale de la Recherche (SCOBIM project, 06-JCJC0002).

## References

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996–2004) GENETIX 4.02 logiciel sous Windows pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome Interactions, CNRS UMR 5000, Université Montpellier II, Montpellier, France.*
- Dubois MP, Jarne P, Jouventin P (2005) Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes*, **5** (4), 905–907.
- Garcia-Paris M, Buchholz DR, Parra-Olea G (2003) Phylogenetic relationships of Pelobatoidea re-examined using mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **28** (1), 12–23.
- Guyétant R, Temmermans W, Avriillier JN (1999) Phenology of the reproduction of *Pelodytes punctatus* Daudin, 1802 (Amphibia, Anura). *Amphibia-Reptilia*, **20** (2), 149–160.
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (version-1.2) — population-genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86** (3), 248–249.
- Richter-Boix A, Llorente GA, Montori A (2006) Breeding phenology of an amphibian community in a Mediterranean area. *Amphibia-Reptilia*, **27** (4), 549–559.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) *Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Sinsch U (1992) Structure and dynamics of a Natterjack toad metapopulation (*Bufo calamita*). *Oecologia*, **90** (4), 489–499.
- Waldbieser GC (1995) PCR-based identification of AT-rich tri- and tetranucleotide repeat loci in an enriched plasmid library. *BioTechniques*, **19** (5), 742–744.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, **10** (4), 506–513.

# Glossaire

**adaptation** : changement phénotypique en réponse à un signal environnemental indiquant une relation fonctionnelle claire avec ce signal. La relation doit résulter en une augmentation de la fitness (croissance, survie, reproduction). 16, 17

**bet-hedging** : stratégie d'étalement des risques. Cela consiste pour un individu, vivant dans un environnement variable dans le temps et imprévisible, à présenter un phénotype aléatoire pour minimiser sa variance de succès. 19, 20, 27, 177, 178

**consanguinité** : reproduction entre individus apparentés produisant une descendance. 12, 15

**dérive** : processus d'échantillonnage aléatoire des individus produisant des modifications des fréquences alléliques. 13–15

**épistasie** : interaction fonctionnelle entre deux gènes, où l'effet d'un gène est modifié par un autre gène. 18

**fitness** : aussi appelée valeur sélective, elle est calculée comme le nombre de descendants viables et fertiles d'un génotype qui passent à la génération suivante (Note : Stearns a dit en 1976 "Fitness is something everybody understand but no one can define precisely"...ça me rassure !. 14–16, 18, 19, 27, 32, 38, 97, 98, 139, 140, 178

**génotype** : composition allélique des gènes d'un individu, c'est donc l'information portée par le génome (ADN). 13, 14, 16, 17, 19, 20, 28, 32, 33, 70, 139

**héritabilité** : part de variance phénotypique expliquée par la variance génétique (additive). 18, 34, 140, 182

**panmictique** : se dit d'une population idéale où tous les individus ont autant de chance de se reproduire entre eux (les couples se forment alors totalement au hasard). 69

**phénotype** : ensemble des caractères observables chez un organisme. Il dépend de l'expression du génotype et de son interaction avec l'environnement. 13, 14, 16–19, 28, 32, 69, 139, 140, 178

**pléiotropie** : phénomène observé lorsque l'expression d'un gène influe plusieurs caractères phénotypiques. 18

**recombinaison** : brassage génétique qui génère de nouvelles combinaisons génétiques (la recombinaison se passe à la méiose chez les Eucaryotes). 13

**semelparité/itéroparité** : fait de se reproduire une seule fois (semel-) ou plusieurs fois (itero-) ou ) au cours de sa vie. 27

**synapomorphie** : caractère dérivé partagé entre espèces, elle est héritée d'un ancêtre commun. 3

**taille efficace** : effectif d'une population idéale pour lequel on observerait un degré de dérive équivalent à celui de la population réelle. 15, 139, 179

**traits d'histoire de vie** : l'ensemble des caractères mesurables d'un individu contribuant directement à la production et à la survie des descendants (exemples : âge à la maturité sexuelle, fécondité, taille des œufs, longévité...). iv, 1, 12, 178, 179